

# 飼料研究報告

第41号

平成28年

## Research Report of Animal Feed

Vol. 41  
2016



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

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）は、農林水産省との密接な連携の下に、専門技術的知見を活かして、肥料、農薬、飼料、ペットフード等に関する安全性の検査、食品の表示等に関する検査等の効率的・効果的な推進、食品や農業資材に関する情報の提供などを行い、国民の視点に立った、より質の高いサービスの提供に努め、食品等の品質、安全と消費者の信頼の確保に技術で貢献しています。また、FAMICの飼料部門は、国際獣疫事務局（OIE）の「飼料の安全と分析」分野のコラボレーティング・センターとして、飼料の安全と分析に関する技術情報を発信することなどを通じて、安全な畜産物の国際取引の確保等に寄与しています。

飼料及びペットフードについては、農林水産省等の関係府省が「飼料安全法」及び「ペットフード安全法」に基づく基準規格（残留農薬、有害物質、添加物など）を設定し、飼料等の関係事業者がこの基準規格を遵守することにより、飼料等の安全確保が図られています。これらの法律に基づく基準規格の設定に当たっては、先ずはその目的に応じた性能（選択性、検量線の直線性、真度、精度、検出限界と定量限界など）を有する試験法により、科学的に信頼できるデータを得ることが重要です。このため、FAMICでは飼料等の分析法の開発、改良等を行うとともに、分析法の妥当性確認を行って、公定分析法を確立しています。また、確立した公定分析法を用いて飼料等のサーベイランス・モニタリングを行い、有害物質による汚染実態の把握や基準規格の遵守状況の確認を行うことを通じて、飼料等の安全確保に貢献しています。

『飼料研究報告』は、FAMICの飼料部門における飼料及び飼料添加物並びにペットフードの分析及び鑑定技術の改善、検査手法・試験法の開発又は改良等を目指して実施した調査・研究成果や学術雑誌等に投稿等して公表した研究成果を取りまとめたものです。これらの研究成果は「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）又は「愛玩動物用飼料等の検査法」（平成21年9月1日付け21消技第1764号。FAMIC理事長制定）に記載されるほか、『飼料分析法・解説 -2009-』（飼料分析基準研究会編書）の改訂の際に掲載される予定です。

最後に、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、FAMICの技術レベルの更なる向上のために、引き続き、御指導、御鞭撻を賜りますよう、お願い申し上げます。

平成28年9月

理事長 木村 真人

## 謝 辞

本報告に掲載した分析法の開発及び報告書の作成に当たり、助言賜り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 27 年度飼料分析基準検討会委員  
(敬称略。五十音順。役職は平成 28 年 3 月現在。)

- |        |   |
|--------|---|
| 石黒 瑛一  | 一般財団法人日本食品分析センター 顧問                                 |
| 永西 修   | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構<br>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 | 公益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  | AOAC インターナショナルフェロー                                  |
| 中島 正博  | 名古屋市衛生研究所 食品部長                                      |
| 永山 敏廣  | 明治薬科大学 薬学部 教授                                       |
| 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 教授                                 |
| 松井 徹   | 国立大学法人京都大学大学院 農学研究科 教授                              |
| 松井 利郎  | 国立大学法人九州大学 農学研究院 教授                                 |
| 宮崎 茂   | 一般財団法人生物科学安全研究所 参与                                  |
| 安井 明美  | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構<br>食品総合研究所 アドバイザー           |



## 目 次

1 飼料中のアセフェート及び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同時定量法	齊木 雅一	1
2 飼料中のイマザピック及びイマザピル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	桑原 正良, 中村 哲	17
3 飼料用イネ中のエスプロカルブ他 4 成分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	吉村 哲史, 若宮 洋市	33
4 稲わら中のオキシリニック酸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	三井 友紀子, 森口 里美	54
5 大豆及び大豆油かす中のジカンバ及び DCSA 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	小塚 健志, 新井 詠子, 伊藤 千晶, 高橋 亜紀子	67
6 飼料用イネ中のフサライドのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法	山本 克己, 長久保 眞平, 関口 好浩	87
7 愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中のプロピレングリコールのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法	小塚 健志, 山本 謙吾	102
<b>技術レポート</b>		
1 かび毒の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による一斉分析法の植物性油かす類に対する妥当性確認	鈴木 知華, 名塚 英一, 加藤 耕一, 青山 幸二	118
2 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の妥当性確認 ～デルタメトリン異性体への適用～	松尾 信吾, 榊原 良成	122

3	モネンシンナトリウムの微生物学的試験法、液体クロマトグラフ法及び吸光光度法による定量法のほ乳期子牛育成用配合飼料に対する妥当性確認	
	関口 好浩, 嶋村 知紗, 大島 舞弓, 橋本 仁康, 奥村 寿章, 加藤 まどか, 三枝 尚子, 千原 哲夫	134
4	愛玩動物用飼料等の検査法収載法のスナック製品等への適用のための妥当性確認 ～ゼアラレノン, フモニシン B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> 及び B <sub>3</sub> 並びにプロピレングリコール～	
	野村 昌代, 設楽 賢治, 保田 伊世, 小塚 健志, 伊藤 千晶, 新井 詠子, 高橋 亜紀子	149

### 精度管理

1	平成 27 年度飼料等の共通試料による分析鑑定について	
	鈴木 知華, 義本 将之, 風間 鈴子, 森口 里美, 船木 紀夫, 石塚 優香	166

### 調査資料

1	飼料中の有害物質等のモニタリング等の結果について (平成 27 年度)	
	肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課	194
2	飼料中のダイオキシン類のモニタリング結果について (平成 23~27 年度)	
	加藤 耕一, 山本 謙吾, 青山 幸二	217
3	特定添加物検定結果等について (平成27年度)	
	肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課	222

### 他誌掲載論文 (抄録)

1	HPLC-FL による配合飼料中ノシヘプタイド定量法の妥当性評価	
	山多 利秋, 嶋村 知紗, 浅尾 美由起, 會田 紀雄, 千原 哲夫 (食品衛生学雑誌, 56(4), 173-177 (2015).)	235
2	Formation Ratios of Zearalanone, Zearalenols, and Zearalanols versus Zearalenone during Incubation of <i>Fusarium semitectum</i> on Sorghum and Ratios in Naturally Contaminated Sorghum	
	Koji AOYAMA, Eiichi ISHIKURO, Hiroko NORIDUKI and Masakatsu ICHINOE (食品衛生学雑誌, 56(6), 247-251 (2015).)	235

## CONTENTS

1	Simultaneous Determination of Acephate and Methamidophos in Feed by LC-MS/MS Masakazu SAIKI .....	1
2	Simultaneous Determination of Imazapic and Imazapyr in Feed by LC-MS/MS Masayoshi KUWABARA and Satoru NAKAMURA .....	17
3	Simultaneous Determination of Esprocarb and 4 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS Satoshi YOSHIMURA and Youichi WAKAMIYA .....	33
4	Determination of Oxolinic Acid in Rice Straw by LC-MS/MS Yukiko MITSUI and Satomi MORIGUCHI .....	54
5	Determination of Dicamba and DCSA in Soybean and Soybean Meal by LC-MS/MS Kenji KOZUKA, Eiko ARAI, Chiaki ITO and Akiko TAKAHASHI .....	67
6	Determination of Phthalide in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by GC-MS Katsumi YAMAMOTO, Shinpei NAGAKUBO and Yoshihiro SEKIGUCHI .....	87
7	Determination of Propylene Glycol in Dry and Semi-dry Type Pet Food by GC-MS Kenji KOZUKA and Kengo YAMAMOTO .....	102
§ Technical report		
1	Method Validations of the Simultaneous Determination Method of Mycotoxins by LC-MS/MS for Oil Meals Chika SUZUKI, Eiichi NAZUKA, Koichi KATO and Koji AOYAMA .....	118
2	Validation Study on Analyte Expansion to the Simultaneous Determination Method of Pesticides in Feed by GC-MS for <i>α-R</i> -Deltamethrin and <i>trans</i> -Deltamethrinin Shingo MATSUO and Yoshinari SAKAKIBARA .....	122

3	Method Validations of Microbiological Assay, Liquid Chromatography and Absorptiometry for Determination of Monensin Sodium in Formula Feed for Suckling Calves	Yoshihiro SEKIGUCHI, Chisa SHIMAMURA, Mayu OSHIMA, Yoshiyasu HASHIMOTO, Toshiaki OKUMURA, Madoka KATO, Naoko SAEGUSA and Tetsuo CHIHARA	134
4	Validation Study on Application of Analytical Methods of Zearalenone, Fumonisin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> and B <sub>3</sub> , and Propylene Glycol to Snack Type Pet Foods	Masayo NOMURA, Chiaki ITO, Kenji SHIDARA, Iyo YASUDA, Kenji KOZUKA, Eiko ARAI and Akiko TAKAHASHI	149
§ Proficiency test			
1	Proficiency Test (in the Fiscal Year 2015)	Chika SUZUKI, Masayuki YOSHIMOTO, Reiko KAZAMA, Satomi MORIGUCHI, Norio FUNAKI and Yuka ISHIZUKA	166
§ Investigative report			
1	Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2015)	Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	194
2	Monitoring Results of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in Feeds (in the Fiscal Years 2011~2015)	Koichi KATO, Kengo YAMAMOTO and Koji AOYAMA	217
3	Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2015)	Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	222
§ Papers accepted in other journals (abstract)			
1	Validation Study on a Method of Determination of Nosiheptide in Formula Feeds by HPLC-FL	Toshiaki YAMATA, Chisa SHIMAMURA, Miyuki ASAO, Norio AITA and Tetsuo CHIHARA (Food Hygiene and Safety Science, 56(4), 173-177 (2015).)	235
2	Formation Ratios of Zearalenone, Zearalenols, and Zearalanols <i>versus</i> Zearalenone during Incubation of <i>Fusarium semitectum</i> on Sorghum and Ratios in Naturally Contaminated Sorghum	Koji AOYAMA, Eiichi ISHIKURO, Hiroko NORIDUKI and Masakatsu ICHINOE (Food Hygiene and Safety Science, 56(6), 247-251 (2015).)	235

# 1 飼料中のアセフェート及び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同時定量法

齊木 雅一\*

## Simultaneous Determination of Acephate and Methamidophos in Feed by LC-MS/MS

Masakazu SAIKI\*

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

An analytical method was developed to simultaneously determine the levels of acephate and methamidophos in feed using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to the samples, acephate and methamidophos were extracted with acetone and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The sample solution was purified with Chem Elut (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA), Envi-Carb (Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA) and Sep-Pak Plus Silica Cartridge (Waters Corporation; Milford, MA, USA) and injected into the LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of acephate and methamidophos. LC separation was carried out on an ODS column (TSKgel ODS-100V, 2.0 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Tosoh Corporation; Tokyo, Japan). In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on formula feeds, wheat, corn, rice straw and alfalfa hay. Formula feeds and corn were spiked with acephate at the levels of 0.01 or 0.5 mg/kg and methamidophos at the levels of 0.01 or 0.1 mg/kg. Wheat was spiked with acephate at the levels of 0.01 or 0.1 mg/kg, and methamidophos at the levels of 0.01, 0.02 or 0.1 mg/kg. Rice straw was spiked with acephate and methamidophos at the levels of 0.01 or 0.1 mg/kg. Alfalfa hay was spiked with acephate and methamidophos at the levels of 0.1 or 3 mg/kg. The resulting mean recoveries ranged from 70.3 % to 86.9 % for acephate and 72.5 % to 90.3 % for methamidophos. The repeatability in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>) were not more than 9.9 % for acephate and 15 % for methamidophos.

A collaborative study was conducted in ten laboratories using formula feed for dairy cattle, corn and alfalfa hay spiked with acephate and methamidophos. Formula feed for dairy cattle was spiked with 0.1 mg/kg of acephate and 0.01 mg/kg of methamidophos. Corn was spiked with 0.5 mg/kg of acephate and 0.1 mg/kg of methamidophos. Alfalfa hay was spiked with 3 mg/kg of acephate and 0.1 mg/kg of methamidophos. The mean recoveries, the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat, respectively, were 74.9 % to 82.7 %, 1.7 % to 4.8 %, 8.4 % to 15 % and not more than 1.0 for acephate, and 81.5 % to 100 %, 2.0 % to 8.4 %, 15 % to 18 % and not more than 0.83 for methamidophos.

This method was validated and established for use in the inspection of acephate and methamidophos in feed.

Key words: feed; acephate; methamidophos; liquid chromatography-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); 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：飼料；アセフェート；メタミドホス；液体クロマトグラフトンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；共同試験

## 1 緒言

アセフェートは有機リン系の殺虫剤であり，日本では 1973 年に農薬登録がされている．商品名「オルトラン」やジェネリック農薬「ジェイエース」などとして，アブラムシ等の防除を目的に，野菜や花き，未成熟とうもろこし，マメ科牧草等に使用されている．

アセフェートの加水分解生成物でもある有機リン系殺虫剤のメタミドホスは，毒性が高く，日本では農薬登録がないため，農薬取締法に基づき国内での製造・輸入・使用は禁止されているが，EU ではジャガイモ，アメリカではジャガイモ，トマト，綿花などに使用されている．

飼料中の残留基準値は，アセフェートについては，農林水産省令<sup>1)</sup>によりとうもろこしで 0.5 mg/kg，牧草で 3 mg/kg と設定されており，メタミドホスについては設定されていない．また，厚生労働省の食品，添加物等の規格基準における残留農薬基準値は，アセフェートについては，とうもろこしで 0.5 ppm，綿実で 2 ppm，メタミドホス（アセフェート由来を含む．）については，玄米，小麦，大麦，ライ麦及びその他の穀類で 0.01 ppm，とうもろこし及び綿実で 0.1 ppm となっている<sup>2)</sup>．

今回，財団法人日本食品分析センターが開発した分析法<sup>3)</sup>（以下「JFRL 法」という．）を基に，飼料分析基準への適用の可否について検討したので，その概要を報告する．

参考にあセフェート及びメタミドホスの構造式等を Fig. 1 に示した．

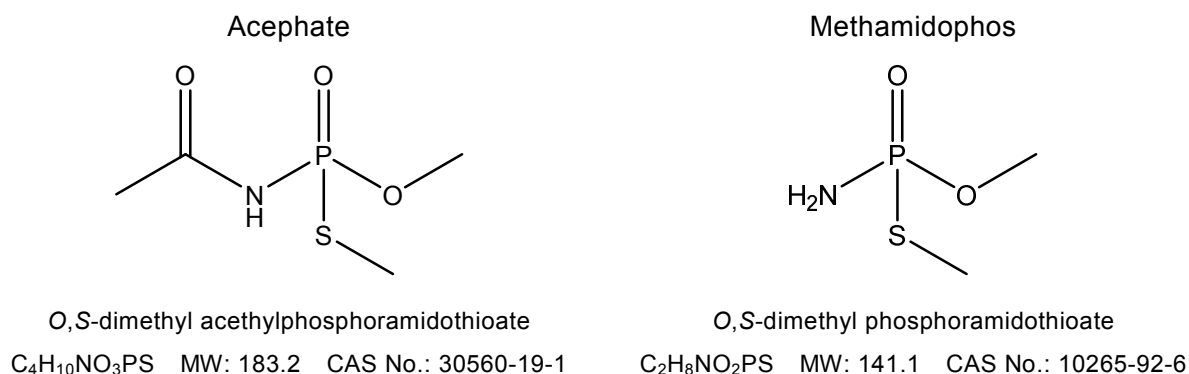


Fig. 1 Chemical structures of acephate and methamidophos

## 2 実験方法

### 2.1 試料

配合飼料（成鶏飼育用，種豚育成用及び乳用牛飼育用），大麦，小麦，とうもろこし，稲わら及びアルファルファ乾草はそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した．なお，検討に用いた配合飼料の原材料名等を Table 1 に示した．

Table 1 Composition of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layer	Grains	60	Corn, milo, wheat, polished rice
	Oil seed meal	27	Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal
	Animal by-products	1	Fish meal, meat and bone meal (derived from pork and chicken)
	Brans	1	Wheat bran
	Others	11	Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, saponified paprika extracts, silica, feed additives
For boar	Grains	54	Corn, milo, polished rice
	Oil seed meal	17	Rapeseed meal, soybean meal
	Brans	13	Wheat bran, rice bran
	Animal by-products	1	Fish meal
	Others	15	Beet pulp, molasses, calcium carbonate, calcium phosphate, dried ocher, salt, glucose, oligosaccharide syrup, fatty acid calcium salt (soap), feed additives
For dairy cattle	Grains	55	Corn, lupine, wheat, corn starch
	Oil seed meal	26	Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal
	Brans	16	Corn gluten feed, wheat bran, screening pellet, rice bran, corn distiller's dried grains with solubles
	Others	3	Molasses, calcium carbonate, salt, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , feed additives

## 2.2 試 薬

1) ヘキサン、酢酸エチル及びアセトン 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を用いた。水は超純水（JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。酢酸アンモニウム及び塩化ナトリウムは試薬特級を用いた。

### 2) アセフェート標準原液

アセフェート標準品（純度 99.0%，Dr. Ehrenstorfer 製）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アセフェート標準原液を調製した（この液 1 mL は、アセフェートとして 0.5 mg を含有する。）。

### 3) メタミドホス標準原液

メタミドホス標準品（純度 98.5%，Dr. Ehrenstorfer 製）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。）。

### 4) 農薬混合標準液

アセフェート及びメタミドホス標準原液各 1 mL を 25 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し、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、アセフェート及びメタミドホスとして各 20 µg を含有する。）。

使用に際して、農薬混合標準原液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した後、水 20 mL を正確に加えて、1 mL 中にアセフェート及びメタミドホスとして 1 µg を含有する溶液を調製した。この液の一定量を、水で正確に希釈し、1 mL 中にアセフェート及びメタミドホスとして 0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1,

0.15, 0.2 及び 0.25  $\mu\text{g}$  を含有する各農薬混合標準液を調製した。

### 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 乾牧草用粉碎機：SM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数（仕様）1430 rpm）
- 3) 振とう機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）
- 4) 多孔性ケイソウ土カラム：Chem Elut（5 mL 保持用）Agilent Technologies 製
- 5) グラファイトカーボンミニカラム：ENVI-Carb（充てん剤量 500 mg）Sigma-Aldrich 製
- 6) シリカゲルミニカラム：Sep-Pak Plus Silica（充てん剤量 690 mg）Waters 製
- 7) 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。）：  
LC 部：ACQUITY UPLC Waters 製  
MS 部：Quattro Premier XE Waters 製

### 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 20 mL（乾牧草は 30 mL）を加え，30 分間静置後，アセトン 100 mL（乾牧草は 120 mL）を加え，30 分間振り混ぜて抽出した。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。乾牧草（稲わらを除く。以下同じ。）については，この液の一定量をアセトンで正確に 10 倍希釈した。この液 8 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ，40  $^{\circ}\text{C}$  以下の水浴で 1 mL 以下まで減圧濃縮した後，水 3 mL 及び塩化ナトリウム 1 g を加えて溶かし，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，10 分間静置した。試料溶液の入っていた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出させた。

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。200 mL のなす形フラスコをグラファイトカーボンミニカラムの下に置き，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アセフェート及びメタミドホスを溶出させた。更に酢酸エチル 40 mL をカラムに加えて同様に溶出させた。溶出液を 40  $^{\circ}\text{C}$  以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し，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，洗液を順次ミニカラムに加え，同様に流出させた。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き，ヘキサン-アセトン（1+1）20 mL をミニカラムに加えてアセフェート及びメタミドホスを溶出させた。溶出液を 40  $^{\circ}\text{C}$  以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し，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、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

#### 4) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各農薬混合標準液各 2  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出（以下「SRM」という。）クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	TSKgel ODS-100V (2.0 mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m), Tosoh
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate-methanol (19:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	120 $^{\circ}$ C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (800 L/h, 350 $^{\circ}$ C)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.20 mL/h)
Capillary voltage	0.5 kV

Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )		
Acephate	184	143	—	20	5
		—	49	20	20
Methamidophos	142	94	—	30	15
		—	125	30	15

#### 5) 計 算

得られた SRM 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、試料中のアセフェート量及び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。

- Sample 10.0 g (300 mL Erlenmeyer flask)
- add 20 mL of water (grass hay: 30 mL) and allow to stand for 30 min
  - add 100 mL of acetone (grass hay: 120 mL) and shake for 30 min
  - filtrate through No. 5B under reduced pressure
  - wash with 50 mL of acetone
  - fill up to 200 mL with acetone
  - dilute sample solution of grass hay except rice straw 10-fold with acetone
  - 8 mL of sample solution
  - evaporate to the volume of 1 mL under 40 °C
  - add 3 mL of water and 1 g of sodium chloride
- Chem Elut and ENVI-Carb cartridge
- apply sample solution to Chem Elut and allow to stand for 10 min
  - wash with 10 mL of hexane (four times)
  - attach ENVI-Carb cartridge (prewashed with 5 mL ethylacetate) under Chem Elut
  - wash with 10 mL of ethylacetate (twice)
  - elute with 40 mL of ethylacetate
  - evaporate to dryness under 40 °C
  - dissolve in 5 mL of hexane-acetone (7:3)
- Sep-Pak Plus Silica cartridge
- prewash with 5 mL of hexane-acetone (7:3)
  - apply sample solution
  - wash with 2.5 mL of hexane-acetone (7:3) (three times)
  - elute with 20 mL of hexane-acetone (1:1)
  - evaporate to dryness under 40 °C
  - dissolve in 1 mL of water
- LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for acephate and methamidophos in feed

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

2.2 の 4) に従って調製した各農薬混合標準液各 2  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。得られた検量線の一例は、Fig. 2 に示すとおりであり、アセフェート及びメタミドホスは、いずれも 0.0025~0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (注入量として 0.005~0.5 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

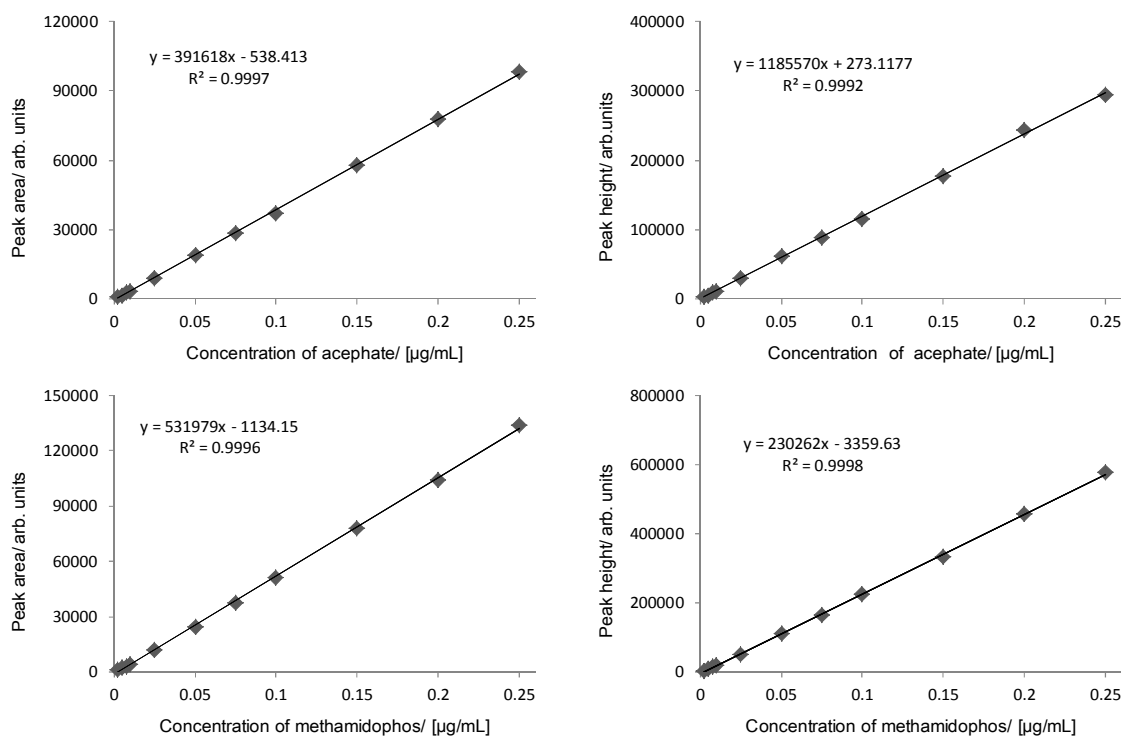


Fig. 2 Calibration curves of acephate and methamidophos by peak area (left) and peak height (right)

### 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からの流出画分の確認

とうもろこしを用い、2.4の1)により調製したカラム処理Iに供する試料溶液に、アセフェートとして0.5 mg/kg相当量（最終試料溶液中で0.2 µg/mL相当量）及びメタミドホスとして0.1 mg/kg相当量（最終試料溶液中で0.04 µg/mL相当量）を添加し、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を確認した。その結果はTable 4のとおり、ヘキサン0~40 mLの画分では溶出せず、酢酸エチル0~60 mLの画分ですべて溶出し、60~120 mLの画分には溶出しなかった。このことから、JFRL法と同様に酢酸エチル60 mLで溶出させることにした。なお、JFRL法では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6回洗浄しているが、操作の簡略化のために酢酸エチル10 mLずつで2回洗浄後、酢酸エチル40 mLを加えて溶出させることとした。

Table 4 Elution pattern of acephate and methamidophos from Chem-Elut / ENVI-Crb

Pesticides	Recovery <sup>a)</sup> (%)						Total
	Hexane	Ethyl acetate					
	0~40 mL	0~40 mL	40~60 mL	60~80 mL	80~100 mL	100~120 mL	
Acephate	0.0	76.7	3.2	0.0	0.0	0.0	79.9
Methamidophos	0.0	91.9	0.0	0.0	0.0	0.0	91.9

a) Mean ( $n=3$ )

### 3.3 シリカゲルミニカラムからの流出画分の確認

とうもろこしを用い、2.4の1)及び2)により調製したカラム処理IIに供する試料溶液に、アセフェートとして0.5 mg/kg相当量（最終試料溶液中で0.2 µg/mL相当量）及びメタミドホスとして0.1 mg/kg相当量（最終試料溶液中で0.04 µg/mL相当量）を添加し、シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した。また、JFRL法では試料溶液の入っていたなす形フラスコを洗浄する操作がないため、ヘキサン-アセトン（7+3）2.5 mLで3回洗浄する操作を追加した。その結果はTable 5のとおり、ヘキサン-アセトン（7+3）0~12.5 mLの画分では溶出せず、ヘキサン-アセトン（1+1）0~20 mLの画分で全て溶出し、20~40 mLの画分には溶出しなかった。このことから、JFRL法と同様にヘキサン-アセトン（1+1）20 mLで溶出させることにした。

Table 5 Elution pattern of acephate and methamidophos from Sep-Pak Plus Silica

Pesticides	Recovery <sup>a)</sup> (%)					Total
	Hexane-acetone (7:3)	Hexane-acetone (1:1)				
	0~12.5 mL	0~10 mL	10~20 mL	20~30 mL	30~40 mL	
Acephate	0.0	92.1	0.7	0.0	0.0	92.8
Methamidophos	0.0	87.0	2.9	0.0	0.0	89.9

a) Mean (n=3)

### 3.4 妨害物質の検討

成鶏飼育用配合飼料，種豚育成用配合飼料，乳用牛飼育用配合飼料，大麦，小麦，とうもろこし，稲わら及びアルファルファ乾草各1検体を試料として，2.4により調製した試料溶液をLC-MS/MSに注入し，得られたSRMクロマトグラムを確認したところ，いずれの試料においても定量を妨げるピークは認められなかった。

なお，得られたSRMクロマトグラムの一例をFig. 3に示した。

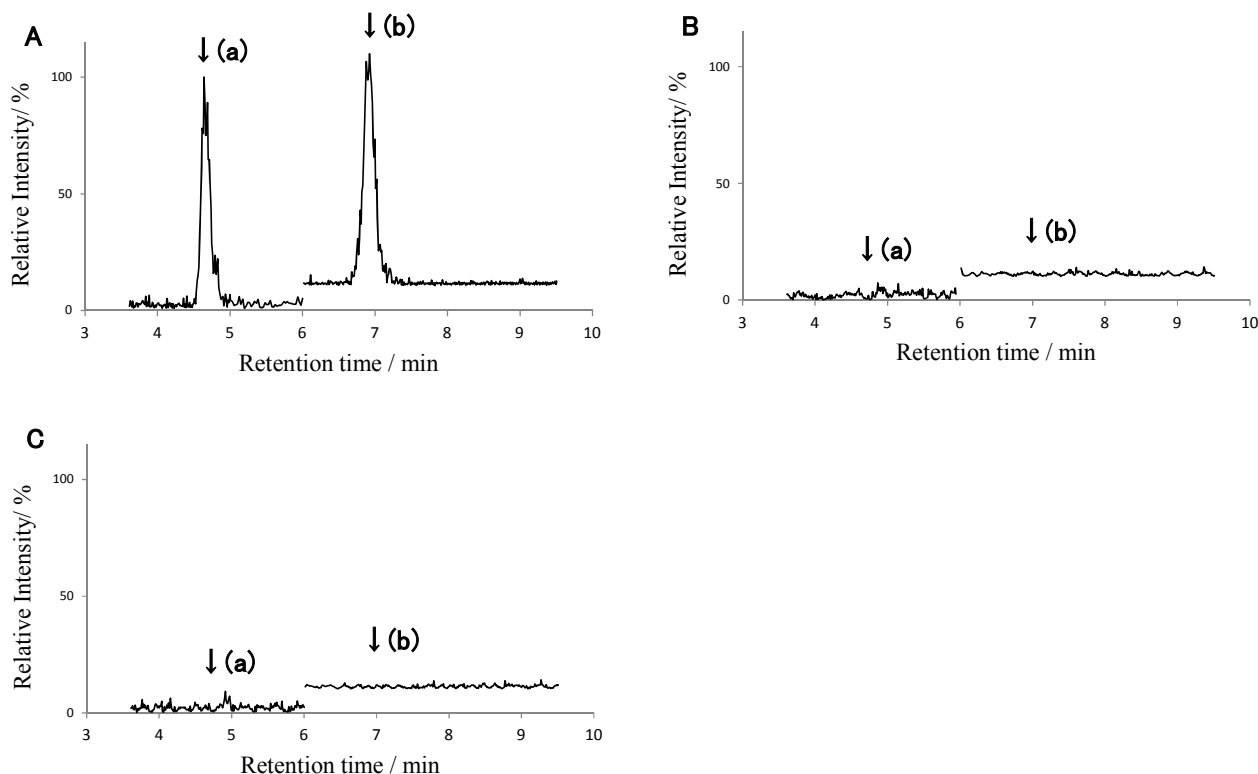


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms of standard solution and blank sample solutions of formula feed for layer and alfalfa hay (Scales of vertical axis are the same between three chromatograms for methamidophos (a) and acephate (b) respectively, and the baselines were shifted for display. Arrows indicate the retention times of methamidophos and acephate.)

A: Standard solution (0.0025  $\mu\text{g/mL}$ : 0.005 ng as each pesticide)

B: Formula feed for layer

C: Alfalfa hay

### 3.5 マトリックス効果の確認

2.4 の 1), 2)及び 3)により調製した成鶏飼育用配合飼料, 乳用牛飼育用配合飼料, 小麦, とうもろこし及び稲わらのブランク試料溶液にアセフェートとして 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.2  $\mu\text{g/mL}$  相当量) 及びメタミドホスとして 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.04  $\mu\text{g/mL}$  相当量), アルファルファ乾草のブランク試料溶液にアセフェートとして 2.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1  $\mu\text{g/mL}$  相当量) 及びメタミドホスとして 1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.04  $\mu\text{g/mL}$  相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について, 同濃度の標準液に対するピーク面積比を確認したところ, ピーク面積比はアセフェートでは 93~101 %, メタミドホスでは 94~101 %であり, アセフェート及びメタミドホスは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

### 3.6 添加回収試験

成鶏飼育用配合飼料, 乳用牛飼育用配合飼料, 小麦, とうもろこし及び稲わらにアセフェートとして 0.01, 0.1 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.004, 0.04 及び 0.2  $\mu\text{g/mL}$  相当量)

及びメタミドホスとして 0.01, 0.02 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.004, 0.008 及び 0.04 µg/mL 相当量）を添加した試料及びアルファルファ乾草にアセフェートとして 0.1 及び 3 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.004 及び 0.12 µg/mL 相当量）及びメタミドホスとして 0.1 及び 3 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.004 及び 0.12 µg/mL 相当量）を添加し、本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は Table 6 のとおり、アセフェートについては、平均回収率は 70.3~86.9 %，その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 9.9 %以下，メタミドホスについては、平均回収率は 72.5~90.3 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 15 %以下の成績が得られた。

なお、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 for acephate and methamidophos

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Formula feed for layer		Formula feed for dairy cattle		Wheat	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)
Acephate	0.01	78.4	1.7	83.4	3.4	78.0	8.9
	0.1	—	—	—	—	83.0	9.9
	0.5	70.3	6.1	83.5	5.1	—	—
Methamidophos	0.01	90.3	7.0	79.6	12	75.8	2.1
	0.02	—	—	—	—	84.3	12
	0.1	83.3	7.7	87.6	5.8	90.2	2.0

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Corn		Rice straw		Alfalfa hay	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)
Acephate	0.01	77.1	8.1	79.0	3.6	—	—
	0.1	—	—	86.9	2.4	73.4	8.8
	0.5	80.5	4.1	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	79.1	2.3
Methamidophos	0.01	81.9	9.5	85.7	13	—	—
	0.1	82.3	5.2	72.5	15	89.0	13
	3	—	—	—	—	73.1	5.8

—: Not tested

a) Mean ( $n = 3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

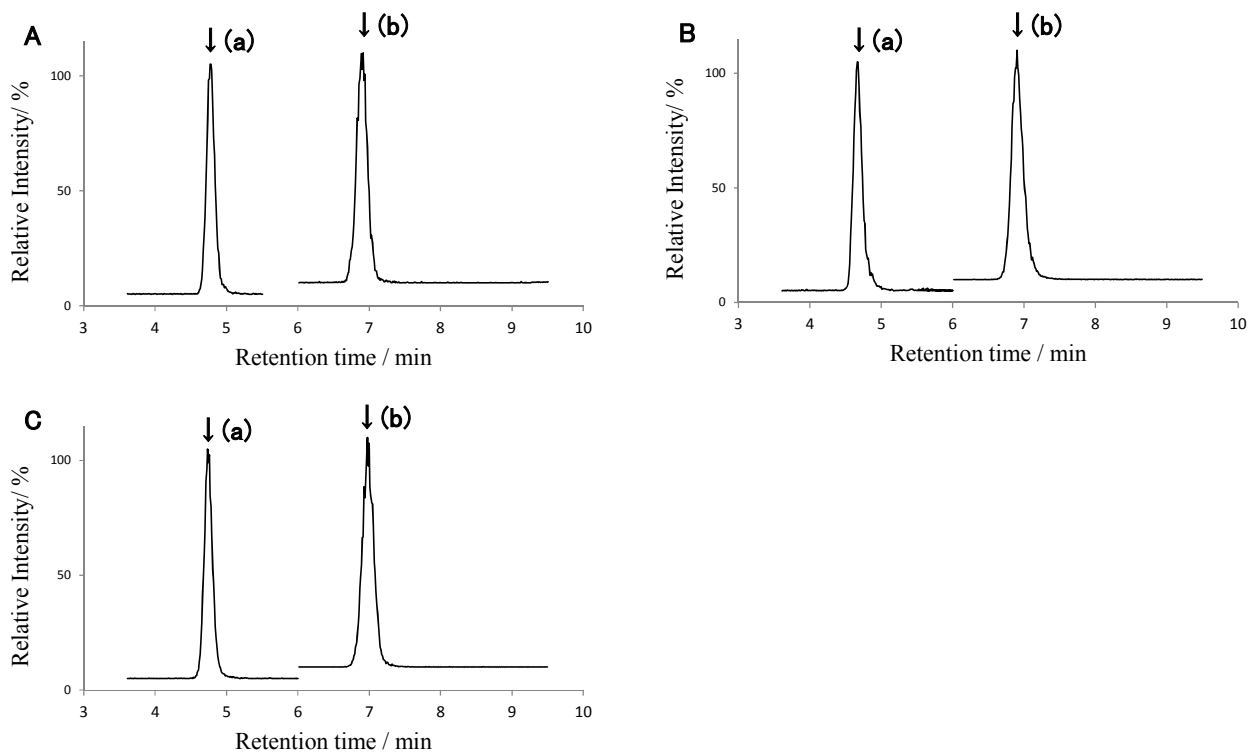


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms of acephate and methamidophos (Arrows indicate the peaks of methamidophos (a) and acephate (b). The peak heights are shown as 100 % in each segment, and the baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (0.1  $\mu\text{g/mL}$ : 0.2 ng as each pesticide)

B: Sample solution of formula feed for layer spiked at 0.5 mg/kg of acephate and 0.1 mg/kg of methamidophos (0.2  $\mu\text{g/mL}$  as acephate and 0.04  $\mu\text{g/mL}$  as methamidophos)

C: Sample solution of alfalfa hay spiked at 3 mg/kg of acephate and 3 mg/kg of methamidophos (0.12  $\mu\text{g/mL}$  as each pesticide)

### 3.7 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、成鶏飼育用配合飼料、乳用牛飼育用配合飼料、小麦、とうもろこし、稲わら及びアルファルファ乾草にアセフェート及びメタミドホスを添加し、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、アセフェートとメタミドホス共に、成鶏飼育用配合飼料、乳用牛飼育用配合飼料、小麦、とうもろこし及び稲わらではSN比が10となる濃度は0.01 mg/kg、SN比が3となる濃度は0.003 mg/kg、アルファルファ乾草ではSN比が10となる濃度は0.1 mg/kg、SN比が3となる濃度は0.03 mg/kgであったことから、乾牧草以外では定量下限は0.01 mg/kg、検出下限は0.003 mg/kg、乾牧草では定量下限は0.1 mg/kg、検出下限は0.03 mg/kgであった。

なお、Table 6 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった。

### 3.8 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の2点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、乳用牛飼育用配合飼料にアセフェートとして 0.1 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.01 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にアセフェートとして 1 µg 及びメタミドホスとして 0.1 µg を含有する標準液 1 mL 添加）、とうもろこしにアセフェートとして 0.5 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.1 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にアセフェートとして 5 µg 及びメタミドホスとして 1 µg を含有する標準液 1 mL 添加）及びアルファルファ乾草にアセフェートとして 3 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.1 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にアセフェートとして 30 µg 及びメタミドホスとして 1 µg を含有する標準液 1 mL 添加）を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた。参加試験室は、一般財団法人食品環境検査協会東京事業所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、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 10 試験室）であった。結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>4), 5)</sup>を参考に、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、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度 ( $RSD_r$ ) 及び室間再現精度 ( $RSD_R$ ) を算出し、得られた  $RSD_R$  から、修正 Horwitz 式<sup>6)</sup>を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 7-1 及び 7-2 のとおりであった。乳用牛飼育用配合飼料、とうもろこし及びアルファルファ乾草について、アセフェートの平均回収率は 81.9, 82.7 及び 74.9 %,  $RSD_r$  は 1.7, 4.8 及び 3.5 %,  $RSD_R$  は 11, 8.4 及び 15 %, HorRat は 0.48, 0.46 及び 1.0, メタミドホスの平均回収率は 81.5, 81.9 及び 100 %,  $RSD_r$  は 2.0, 8.4 及び 4.5 %,  $RSD_R$  は 15, 15 及び 18 %, HorRat は 0.67, 0.70 及び 0.83 であり良好な結果であった。HorRat が 0.50 をわずかに下回っているものがあつたが、本法が愛玩動物用飼料中のメタミドホス分析法<sup>7)</sup>とほぼ同様であり、多くの試験室が経験済みであったためと考えられた。

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



Table 7-1 Collaborative study for acephate

Lab. No.	Feed types					
	Formula feed for dairy cattle		Corn		Alfalfa hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0815	0.0845	0.402	0.462	2.24	2.19
2	0.0727	0.0732	0.385	0.409	2.06	1.96
3	0.0891	0.0916	0.473	0.492	2.62	2.67
4	0.0779	0.0770	0.371	0.421	2.13	2.12
5	0.0786	0.0811	0.394	0.394	2.34	2.10
6	0.0908	0.0921	0.437	0.438	2.58	2.62
7	0.0632	0.0648	0.392	0.365	1.59	1.58
8	0.0854	0.0847	0.385	0.378	2.29	2.21
9	0.0881	0.0865	0.426	0.416	2.27	2.06
10	0.0892	0.0860	0.411	0.414	2.66	2.62
Spiked level (mg/kg)	0.1		0.5		3	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	0.0819		0.413		2.25	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	81.9		82.7		74.9	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	1.7		4.8		3.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	11		8.4		15	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		18		14	
HorRat	0.48		0.46		1.0	

a)  $n=20$ 

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 7-2 Collaborative study for methamidophos

Lab. No.	Feed types					
	Formula feed for dairy cattle		Corn		Alfalfa hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.00899	0.00872	0.0820	0.0858	0.130	0.117
2	0.00853	0.00838	0.0709	0.0743	0.0980	0.0963
3	0.00830	0.00859	0.0955	0.0938	0.121	0.123
4	0.00702	0.00700	0.0734	0.0815	0.0836	0.0906
5	0.00945	0.00944	0.0848	0.0825	0.0833	0.0774
6	0.00817	0.00808	0.0964	0.0955	0.108	0.106
7	0.00602	0.00607	0.0690	0.0728	0.0723	0.0641
8	0.00806	0.00781	0.0771 <sup>a)</sup>	0.0502 <sup>a)</sup>	0.106	0.0974
9	0.00991	0.0102	0.0926	0.0954	0.117	0.118
10	0.00735	0.00693	0.0953	0.0904	0.101	0.0987
Spiked level (mg/kg)	0.01		0.1		0.1	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	0.00815		0.0819		0.100	
Mean recovery <sup>b)</sup> (%)	81.5		81.9		100	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	2.0		8.4		4.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	15		15		18	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	22		22		22	
HorRat	0.67		0.70		0.83	

a) Data excluded by Cochran test

b) Formula feed for cattle:  $n=20$ ; Corn:  $n=18$ ; Alfalfa hay:  $n=20$

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 8 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	LC-MS/MS	LC column
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro premier XE, Waters	TSKgel ODS-100V, Tosoh (2.0 mm×150 mm, 5 µm)
2	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	TSKgel ODS-100V, Tosoh (2.0 mm×150 mm, 5 µm)
6	LC: 1200, Agilent Technologies MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: 1200, Agilent Technologies MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	Acquity UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×150 mm, 1.7 µm)
8	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
9	LC: 1200, Agilent Technologies MS/MS: API-3200 Q TRAP, AB Sciex	TSKgel ODS-100V, Tosoh (2.0 mm×150 mm, 5 µm)
10	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQ MS, Waters	TSKgel ODS-100V, Tosoh (2.0 mm×150 mm, 5 µm)

#### 4 まとめ

飼料中に残留するアセフェート及びメタミドホスについて、JFRL 法を基に、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、カラム処理 I において操作の簡略化のために酢酸エチルでの洗浄回数の変更及びカラム処理 II においてなす形フラスコの洗浄操作がなかったため追加し、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、0.0025~0.25 µg/mL (注入量として 0.005~0.5 ng) の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、0.004~0.2 µg/mL 相当濃度とした。
- 2) 成鶏飼育用配合飼料，種豚育成用配合飼料，乳用牛飼育用配合飼料，大麦，小麦，とうもろこし，稲わら及びアルファルファ乾草について，本法に従って得られたクロマトグラムには，定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 成鶏飼育用配合飼料，乳用牛飼育用配合飼料，小麦，とうもろこし及び稲わらにアセフェートとして 0.01，0.1 及び 0.5 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.01，0.02 及び 0.1 mg/kg 相当量を添加し，アルファルファ乾草にアセフェート及びメタミドホスとして 0.1 及び 3 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求めたところ良好な結果が得られた。

- 4) 本法のアセフェート及びメタミドホスの定量下限は、乾牧草（稲わらを除く。）中で各 0.1 mg/kg, その他の飼料中で各 0.01 mg/kg, 検出下限は、乾牧草（稲わらを除く。）中で各 0.03 mg/kg, その他の飼料中で各 0.003 mg/kg であった。
- 5) 乳用牛飼育用配合飼料にアセフェートとして 0.1 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.01 mg/kg 相当量, とうもろこしにアセフェートとして 0.5 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.1 mg/kg 相当量及びアルファルファ乾草にアセフェートとして 3 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 10 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ, 良好な結果が得られた。

## 謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人食品環境検査協会東京事業所, 全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所, 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所, 一般財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センターにおける関係者各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令, 昭和 51 年 7 月 24 日, 省令第 35 号 (1976).
- 2) 厚生省告示：食品, 添加物等の基準規格, 昭和 34 年 12 月 28 日, 告示第 370 号 (1959).
- 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) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 5) AOAC Int. (2012). Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. In official methods of an alysis of AOAC Int. 19 ed., Gaithersburg, MD, USA.
- 6) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).
- 7) 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).

## 2 飼料中のイマザピック及びイマザピル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

桑原 正良\*, 中村 哲\*

### Simultaneous Determination of Imazapic and Imazapyr in Feed by LC-MS/MS

Masayoshi KUWABARA\* and Satoru NAKAMURA\*

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

An analytical method was developed to determine the levels of imazapic and imazapyr in feed using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to the samples, imazapic and imazapyr were extracted with hydrochloric acid (0.02 mol/L)-methanol (2:3) and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with hydrochloric acid (0.02 mol/L)-methanol (2:3) to a final volume of 200 mL. The sample solution was purified with InertSep C18-C (GL sciences Inc.; Tokyo, Japan) and Bond Elut SCX (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA), and injected into the LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of imazapic and imazapyr. LC separation was carried out on an ODS column (Inertsil ODS-3, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 4 µm from GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) using a gradient with 0.1 v/v% formic acid solution and methanol as the mobile phase. In the MS/MS analysis, negative mode electrospray ionization (ESI-) was used.

Recovery tests were conducted on formula feed for finishing beef cattle, wheat, soybean, corn, soybean meal and Sudangrass hay. The formula feed for cattle was spiked with 0.005 or 0.01 mg/kg of imazapic, and 0.005, 0.01 or 0.05 mg/kg of imazapyr. Wheat was spiked with 0.005, 0.01 or 0.05 mg/kg of imazapic, and 0.005, 0.01 or 0.05 mg/kg of imazapyr. Soybean was spiked with 0.005, 0.05 or 0.5 mg/kg of imazapic, and 0.005, 0.05 or 5 mg/kg of imazapyr. Corn was spiked with 0.005 or 0.01 mg/kg of imazapic, and 0.005, 0.01 or 0.05 mg/kg of imazapyr. Soybean meal was spiked with 0.005, 0.05 or 0.5 mg/kg of imazapic, and 0.005, 0.05 or 7 mg/kg of imazapyr. Sudangrass hay was spiked with 0.05, 0.5 or 3 mg/kg of imazapic, and 0.05, 0.5 or 30 mg/kg of imazapyr. The mean recoveries ranged from 82.7 % to 106 % for imazapic and 84.9 % to 109 % for imazapyr. The relative standard deviations of repeatability ( $RSD_r$ ) were not more than 7.0 % for imazapic and 6.7 % for imazapyr.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using formula feed for finishing beef cattle, wheat, corn, soybean meal and Sudangrass hay spiked with imazapic and imazapyr. Formula feed for finishing beef cattle was spiked with 0.01 mg/kg of imazapic and 0.05 mg/kg of imazapyr. Wheat was spiked with 0.05 mg/kg of imazapic and 0.05 mg/kg of imazapyr. Corn was spiked with 0.01 mg/kg of imazapic and 0.05 mg/kg of imazapyr. Soybean meal was spiked with 0.5 mg/kg of imazapic and 7 mg/kg of imazapyr. Sudangrass hay was spiked with 3 mg/kg of imazapic and 30 mg/kg of imazapyr. The ranges of mean recoveries, the relative standard deviations of repeatability ( $RSD_r$ ), the relative standard deviations of reproducibility ( $RSD_R$ ) and HorRat, respectively, were 81.4 % to 98.2 %, 3.6 % to 10 %, 6.8 % to 14 % and 0.38 to 0.65 for imazapic, and 76.6 % to 91.0 %, 2.2 % to 13 %, 6.2 % to 20 % and 0.49 to 0.90 for imazapyr.

This method was validated and established for use in the inspection of imazapic and imazapyr in feed.

\* 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

Key words: feed; imazapic; imazapyr; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); collaborative study

キーワード：飼料；イマザピック；イマザピル；高速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；共同試験

## 1 緒 言

イマザピック及びイマザピルは、American Cyanamid Co. (現 BASF SE) により開発されたイミダゾリノン系除草剤である。それらの作用機構は分岐鎖アミノ酸の植物体内での生合成を司るアセトヒドロキシ酸合成酵素を阻害し、DNA 合成及び細胞分裂を阻止して枯死させると考えられている<sup>1),2)</sup>。飼料中の残留基準値は、イマザピックにおいては、小麦 0.05 mg/kg, 大豆 0.5 mg/kg, とうもろこし 0.01 mg/kg, 大豆油かす 0.5 mg/kg 及び牧草 3 mg/kg, また、イマザピルにおいては、小麦 0.05 mg/kg, 大豆 5 mg/kg, とうもろこし 0.05 mg/kg, 大豆油かす 7 mg/kg 及び牧草 30 mg/kg である<sup>3)</sup>。

飼料中の分析法は、一般財団法人日本食品分析センターが「平成 26 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業」において開発した方法<sup>4)</sup> (以下「JFRL 法」という。)がある。この JFRL 法を基に飼料分析基準<sup>5)</sup>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。

参考にイマザピック及びイマザピルの構造式等を Fig. 1 に示した。

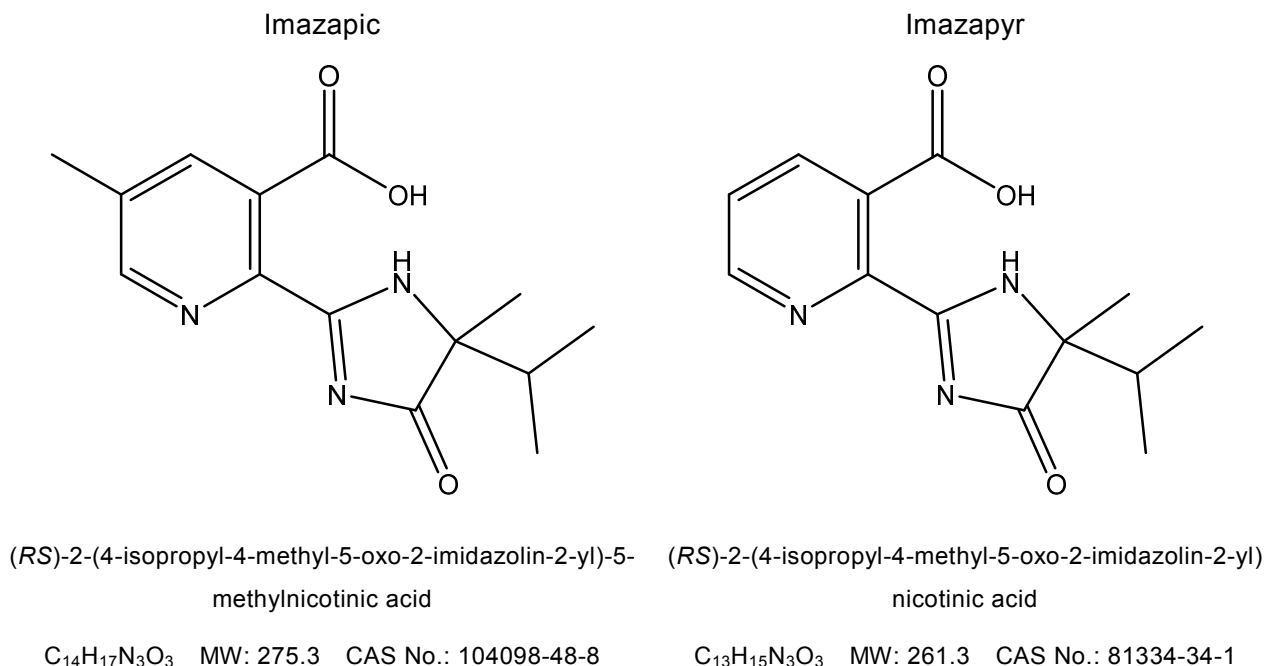


Fig. 1 Chemical structures of imazapic and imazapyr

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

配合飼料（ブロイラー肥育後期用，肉豚肥育用及び肉用牛肥育用），小麦，大豆，とうもろこし，大豆油かす及び乾牧草（アルファルファ乾草及びスーダングラス乾草）をそれぞれ 1 mm の

スクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For finishing period broiler	Grains	61	Corn, polished rice, milo
	Oil seed meal	27	Soybean meal, rapeseed meal
	Animal by-products	3	Chicken meal, fish meal, pork chicken meal
	Brans	1	Rice bran
	Others	8	Animal fat, calcium phosphate, calcium carbonate, salt, feed yeast, fructo-oligosaccharides syrup, silica, feed additives
For finishing pig	Grains	74	Corn, polished rice, milo, wheat, bread crumb
	Oil seed meal	19	Soybean meal, rapeseed meal
	Brans	2	Bran, rice bran
	Others	5	Bakery waste, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, animal fat, feed additives
For finishing beef cattle	Grains	63	Corn, barley, milo
	Brans	30	Bran, corn gluten feed, hominy feed, rice bran
	Oil seed meal	4	Soybean meal, rapeseed meal
	Others	3	Molasses, soybean curd residue, calcium carbonate, salt, feed additives

## 2.2 試薬

- メタノー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。アセトンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。アンモニア水、ギ酸及び塩酸は試薬特級（ギ酸及びアンモニア水はそれぞれ 99 %及び 28 %のもの）を用いた。ケイソウ土は Celite 545 (Imerys Minerals California, Inc.製) を用いた。水は超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。
- イマザピック標準原液  
イマザピック標準品（残留農薬試験用，純度 99.9 %，和光純薬工業製）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イマザピック標準原液を調製した（この液 1 mL は，イマザピックとして 0.5 mg を含有する。）。
- イマザピル標準原液  
イマザピル標準品（残留農薬試験用，純度 99.7 %，関東化学製）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，同溶媒を加えて溶かし，更に標線までアセトンを加えてイマザピル標準原液を調製した（この液 1 mL は，イマザピルとして 0.5 mg を含有する。）。
- 農薬混合標準液  
各標準原液 2 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し，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，イマザピック及びイマザピルとして各 20 µg を含有する。）。更に，農薬混合標準原液の一定量を，0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (7+3) で正確に希釈し，1 mL 中にイマザピック及びイマザピルとして 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 及び 2000 ng を含有する各農薬混合標準液を調製した。

## 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 乾牧草用粉碎機：SM-2000 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数（仕様）1690 rpm）
- 3) 振とう機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 250 rpm）
- 4) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep C18-C（充てん量 1000 mg） ジーエルサイエンス製
- 5) ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：Bond Elut SCX（充てん量 500 mg） Agilent Technologies 製
- 6) 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。）  
LC 部：ACQUITY UPLC System Waters 製  
MS 部：ACQUITY TQD Waters 製

## 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 20 mL（乾牧草は 30 mL）を加え 30 分間静置後，更に塩酸（0.02 mol/L）－メタノール（2+3）100 mL（乾牧草は 120 mL）を加え，30 分間振り混ぜて抽出した．200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き，抽出液をあらかじめケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙（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塩酸（0.02 mol/L）－メタノール（2+3）60 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塩酸（0.02 mol/L）－メタノール（2+3）を加えた．この液 2 mL（乾牧草は，更に塩酸（0.02 mol/L）－メタノール（2+3）で正確に 10 倍希釈した後，その液 2 mL）を 20 mL 以上の試験管等のガラス容器に正確に入れ，塩酸（0.01 mol/L）18 mL を加えて，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メタノール 10 mL 及び塩酸（0.01 mol/L）10 mL で順次洗浄した．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．先のミニカラムの下にあらかじめメタノール 10 mL 及び塩酸（0.01 mol/L）10 mL で順次洗浄したベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結し，試料溶液の入っていたガラス容器を塩酸（0.01 mol/L）－メタノール（1+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．

次に，オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを外し，メタノール 5 mL をベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラムに加え，同様に流出させた．50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き，アンモニア水－メタノール（1+99）10 mL をミニカラムに加え，イマザピック及びイマザピルを溶出させた．溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後，窒素ガスを送って乾固した．0.1 v/v%ギ酸溶液－メタノール（7+3）1 mL を正確に加えて残留物を溶かし，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

試料溶液及び各農薬混合標準液各 4 µL を LC-MS/MS に注入し，選択反応検出（以下「SRM」という．）クロマトグラムを得た．

LC-MS/MS の測定条件を Table 2 及び Table 3 に示した．



Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 4 μm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% formic acid-methanol (8:2) → 10 min → (1:9) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	150 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (650 L/h, 500 °C)
Capillary voltage	1 kV
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.20 mL/min)

Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )		
Imazapic	276	231	—	35	20
		—	163		25
Imazapyr	262	217	—	35	25
		—	69		30

## 4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからイマザピック及びイマザピルのピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中のイマザピック量及びイマザピル量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

- Sample 10 g (300 mL Erlenmeyer flask)
- add 20 mL of water (30 mL for grass hay) and allow to stand for 30 min
  - add 100 mL of HCl (0.02 mol/L)-methanol (2:3) (120 mL for grass hay)
  - shake for 30 min
  - filter through No.5B using diatomite under reduced pressure
  - wash with 60 mL of HCl (0.02 mol/L)-methanol (2:3)
  - fill up to 200 mL with HCl (0.02 mol/L)-methanol (2:3)
  - dilute sample solution of grass hay 10-fold dilution with HCl (0.02 mol/L)-methanol (2:3)
  - transfer 2 mL of sample solution to 20 mL centrifuge tube and add 18 mL of HCl (0.01 mol/L)
- InertSep C18-C and Bond Elut SCX
- prewash each minicolumn with 10 mL of methanol and 10 mL of HCl (0.01 mol/L)
  - apply the sample solution to InertSep C18-C
  - attach Bond Elut SCX under InertSep C18-C
  - wash with 5 mL of HCl (0.01 mol/L)-methanol (1:1) (twice)
  - remove InertSep C18-C and wash with 5 mL of methanol
  - elute with 10 mL of ammonia-methanol (1:99)
  - evaporate to dryness under 40 °C
  - dissolve in 1 mL of 0.1 v/v% formic acid-methanol (7:3)
- LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for imazapic and imazapyr in feed

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

2.2 の 4)に従って調製したイマザピック及びイマザピルとして各 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 及び 2000 ng/mL 相当量の各農薬混合標準液各 4  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し, 得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及びピーク高さを用いて検量線を作成した. 得られた検量線は, Fig. 2 のとおりであり, イマザピック及びイマザピルで 0.2~2000 ng/mL (注入量として 0.0008~8 ng 相当量) の範囲で直線性を示した.

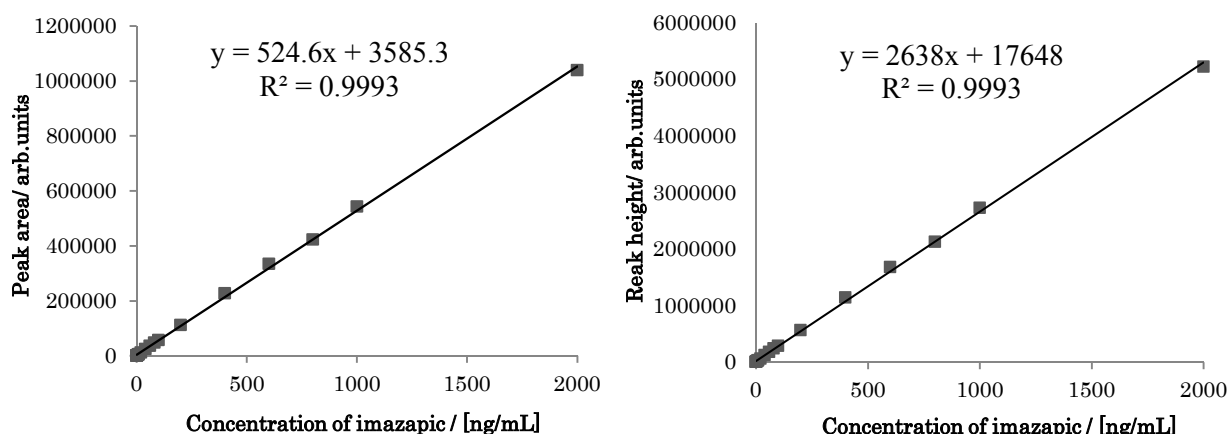


Fig. 2-1 Calibration curves of imazapic by peak area (left) and peak height (right)

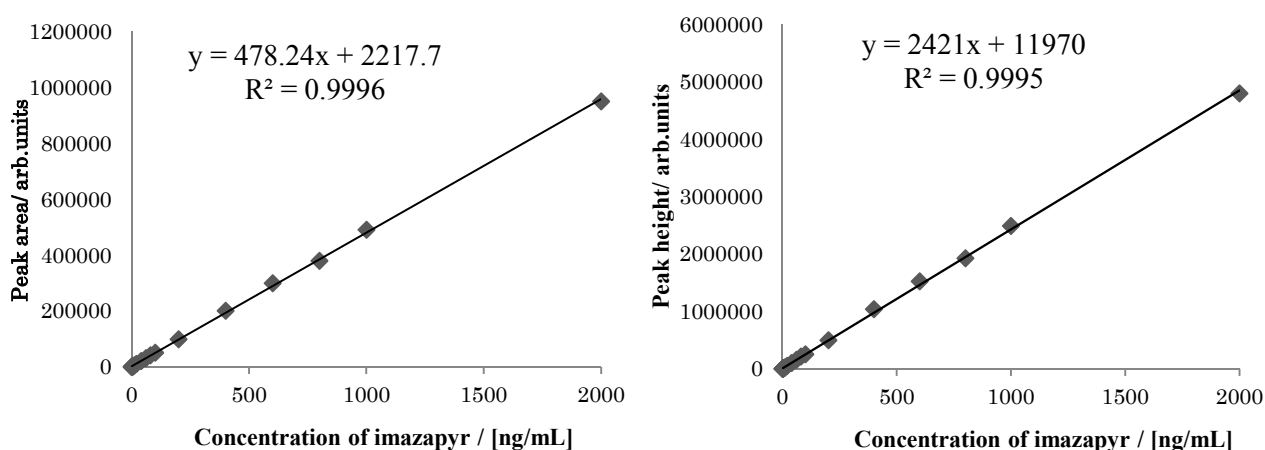


Fig. 2-2 Calibration curves of imazapyr by peak (left) area and peak height (right)

### 3.2 ミニカラムからの溶出画分の確認

#### 1) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

大豆油かすを用い、2.4 の 1) に従って調製した試料溶液にイマザピック及びイマザピルとして 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 50 ng/mL) を添加し、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。その結果は、Table 4 のとおり、イマザピック及びイマザピルは塩酸 (0.01 mol/L) 10 mL の画分では溶出せず、塩酸 (0.01 mol/L) -メタノール (1+1) 0~10 mL の画分に溶出し、10~20 mL の画分には溶出しなかった。以上の結果から、JFRL 法と同様に本カラムにおける溶出液量は、塩酸 (0.01 mol/L) -メタノール (1+1) 10 mL とした。

Table 4 Elution pattern of imazapic and imazapyr from InertSep C18-C

Pesticide	Recovery <sup>a)</sup> (%)						Total
	HCl (0.01 mol/L)		HCl (0.01 mol/L)-methanol (1:1)				
	0~5 mL	5~10 mL	0~5 mL	5~10 mL	10~15 mL	15~20 mL	
Imazapic	0	0	89	3	0	0	92
Imazapyr	0	0	90	0	0	0	90

a) Mean (n=3)

## 2) ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム

大豆油かすを用い、2.4 の 1)に従って調製を行い、2)のオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を行った試料溶液にイマザピック及びイマザピルとして 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 50 ng/mL）を添加し、ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果は、Table 5 のとおり、イマザピル及びイマザピックはオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出溶媒である塩酸（0.01 mol/L）-メタノール（1+1）0~10 mL の画分及びメタノール 5 mL では溶出せず、アンモニア水-メタノール（1+99）0~10 mL の画分に溶出し、10~20 mL の画分には溶出しなかった。以上の結果から、本カラムにおける溶出液量はアンモニア水-メタノール（1+99）10 mL とした。

Table 5 Elution pattern of imazapic and imazapyr from Bond Elut SCX

Pesticide	Recovery <sup>a)</sup> (%)						Total	
	HCl (0.01 mol/L)-methanol (1:1)		Methanol	Ammonia solution-methanol (1:99)				
	0~5 mL	5~10 mL	0~5 mL	0~5 mL	5~10 mL	10~15 mL		15~20 mL
Imazapic	0	0	0	43	54	0	0	97
Imazapyr	0	0	0	41	51	0	0	92

a) Mean (n=3)

## 3.3 妨害物質の検討

配合飼料（ブロイラー肥育後期用，肉豚肥育用及び肉用牛肥育用），小麦，大豆，とうもろこし，大豆油かす及び乾牧草（アルファルファ乾草及びスーダングラス乾草）各 1 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 SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

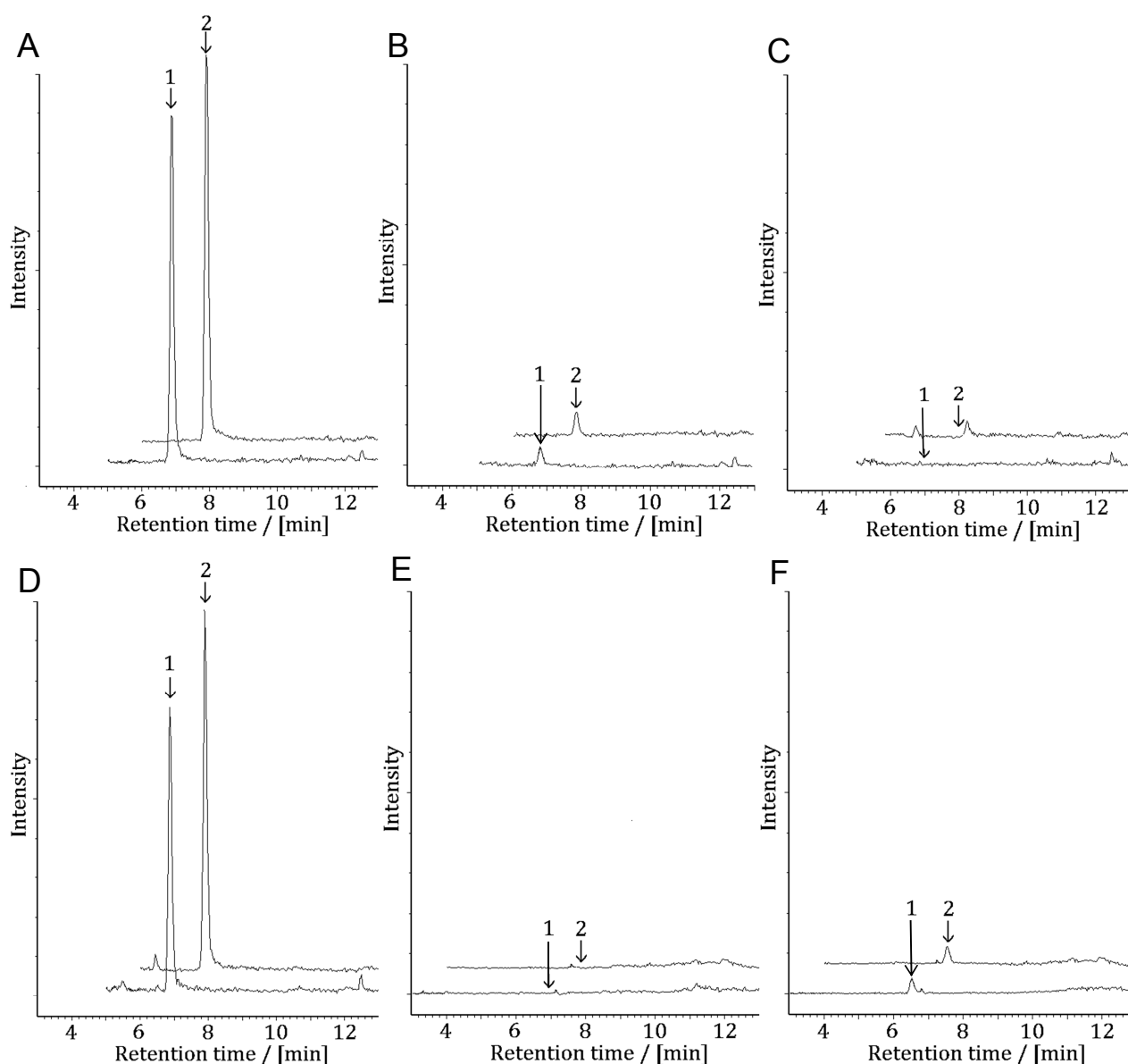


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms

(Arrows indicate the retention times of 1: imazapyr and 2: imazapic. The peak height of the 5 ng/mL standard solution is to be shown as 100 %, and the baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (5 ng/mL: 20 pg as each pesticide)

B: Standard solution (0.5 ng/mL: 2 pg as each pesticide)

C: Sample solution of wheat (blank)

D: Sample solution of wheat spiked at 0.05 mg/kg of imazapic and imazapyr (5 ng/mL as each pesticide)

E: Sample solution of Sudangrass hay (blank)

F: Sample solution of Sudangrass hay spiked at 0.05 mg/kg of imazapic and imazapyr (0.5 ng/mL as each pesticide)

### 3.4 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 2)により調製した配合飼料 (ブロイラー肥育後期用, 肉豚肥育用及び肉用牛肥育

用), 小麦及びとうもろこしのブランク試料溶液にイマザピック及びイマザピルとして各 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 1 ng/mL 相当量), 大豆及び大豆油かすのブランク試料溶液に各 0.04 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 4 ng/mL 相当量), 乾牧草 (アルファルファ乾草及びスーダングラス乾草) のブランク試料溶液に各 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 2 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について, 2.2 の 2) に従って調製した同濃度の農薬混合標準液に対するピーク面積比を確認したところ, イマザピックは 88~98 %, イマザピルは 88~101 % であり, イマザピック及びイマザピルは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

### 3.5 添加回収試験

イマザピックについては, 肉用牛肥育用配合飼料に 0.005 及び 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 1 ng/mL), 小麦に 0.005, 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 1 及び 5 ng/mL) を, 大豆に 0.005, 0.05 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 5 及び 50 ng/mL) を, とうもろこしに 0.005 及び 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 1 ng/mL) を, 大豆油かすに 0.005, 0.05 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 5 及び 50 ng/mL) を, スーダングラス乾草に 0.05, 0.5 及び 3 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 5 及び 30 ng/mL) を, イマザピルについては, 肉用牛肥育用配合飼料に 0.005, 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 1 及び 5 ng/mL) を, 小麦に 0.005, 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 1 及び 5 ng/mL) を, 大豆に 0.005, 0.05 及び 5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 5 及び 500 ng/mL) を, とうもろこしに 0.005, 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 1 及び 5 ng/mL) を, 大豆油かすに 0.005, 0.05 及び 7 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 5 及び 700 ng/mL) を, スーダングラス乾草に 0.05, 0.5 又は 30 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5, 5 及び 300 ng/mL) をそれぞれ添加し, 本法により 3 点併行分析を実施して回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は Table 6 のとおり, イマザピックについては平均回収率 82.7~106 %, その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 7.0 % 以下, イマザピルについては平均回収率 84.9~109 %, その繰返し精度は  $RSD_r$  として 6.7 % 以下であり, 良好な成績が得られた。

Table 6 Recoveries for imazapic and imazapyr

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Formula feed for finishing beef cattle		Wheat		Soybean	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Imazapic	0.005	93.2	2.4	82.7	3.5	89.5	4.4
	0.01	96.0	6.5	87.8	2.3	—	—
	0.05	—	—	100	2.4	96.3	3.3
	0.5	—	—	—	—	96.2	0.4
Imazapyr	0.005	87.9	6.7	88.9	4.9	90.1	6.5
	0.01	93.4	3.8	98.5	3.5	—	—
	0.05	84.9	0.8	105	2.2	102	1.4
	5	—	—	—	—	94.0	0.7

Pesticide	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Corn		Soybean meal		Sudangrass hay	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Imazapic	0.005	87.7	1.7	89.9	5.1	—	—
	0.01	97.7	5.0	—	—	—	—
	0.05	—	—	106	2.1	91.7	7.0
	0.5	—	—	102	1.2	99.4	1.5
	3	—	—	—	—	92.9	0.9
Imazapyr	0.005	95.2	6.2	87.1	4.1	—	—
	0.01	100	4.9	—	—	—	—
	0.05	85.4	0.7	107	2.1	100	5.1
	0.5	—	—	—	—	109	2.3
	7	—	—	98.5	1.4	—	—
	30	—	—	—	—	92.5	0.4

—: Not tested

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 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、イマザピック及びイマザピルを添加し、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、イマザピック及びイマザピルともに  $SN$  比が 10 となる濃度は 0.005 mg/kg (乾牧草は 0.05 mg/kg)、 $SN$  比が 3 となる濃度は 0.002 mg/kg (乾牧草は 0.02 mg/kg) であった。

なお、Table 6 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった。

### 3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、肉用牛肥育用配合飼料にイマザピックとして 0.01 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 0.05 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にイマザピック 0.1 µg 及びイマザピル 0.5 µg を含有する混合標準液 1 mL 添加）、小麦にイマザピックとして 0.05 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 0.05 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にイマザピック 0.5 µg 及びイマザピル 0.5 µg を含有する混合標準液 1 mL 添加）、とうもろこしにイマザピックとして 0.01 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 0.05 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にイマザピック 0.1 µg 及びイマザピル 0.5 µg を含有する混合標準液 1 mL 添加）、大豆油かすにイマザピックとして 0.5 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 7 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にイマザピック 5 µg 及びイマザピル 70 µg を含有する混合標準液 1 mL 添加）並びにスーダングラス乾草にイマザピックとして 3 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 30 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にイマザピック 30 µg 及びイマザピル 300 µg を含有する混合標準液 1 mL 添加）を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた。

参加試験室は、全国農業協同組合飼料畜産中央研究所、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般財団法人食品環境検査協会東京事業所、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）であった。結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>6), 7)</sup>を参考に、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、外れ値の有無の確認及び棄却等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、得られた  $RSD_R$  から、修正 Horwitz 式<sup>8)</sup>を用いて HorRat を求めた。

イマザピックの結果は Table 7 のとおりであり、肉用牛肥育用配合飼料、小麦、とうもろこし、大豆油かす及びスーダングラス乾草について、平均回収率は 87.6, 81.4, 89.0, 98.2 及び 84.4 %,  $RSD_f$  は 9.3, 8.6, 10, 3.6 及び 6.7 %,  $RSD_R$  は 11, 13, 14, 6.8 及び 9.1 %, HorRat は 0.50, 0.61, 0.64, 0.38 及び 0.65 であった。得られた HorRat について、0.50 を下回っているものがみられたが、分析操作が比較的簡便であることによるものと考えられた。

イマザピルの結果は Table 8 のとおりであり、肉用牛肥育用配合飼料、小麦、とうもろこし、大豆油かす及びスーダングラス乾草について、平均回収率は 76.6, 78.8, 83.7, 89.4 及び 91.0 %,  $RSD_f$  は 7.6, 13, 8.6, 2.2 及び 3.8 %,  $RSD_R$  は 19, 20, 19, 6.2 及び 4.8 %, HorRat は 0.85, 0.90, 0.85, 0.51 及び 0.49 であった。得られた HorRat について、0.50 を下回っているものがみられたが、分析操作が比較的簡便であることによるものと思われた。

参考のため、各試験室で使用した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計の機種等を Table 9 に示した。



Table 7 Collaborative study for imazapic

Lab. No.	Feed types									
	Formula feed for finishing beef cattle		Wheat		Corn		Soybean meal		Sudangrass hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0103	0.00781	0.0526	0.0463	0.0103	0.00827	0.516	0.490	2.78	2.99
2	0.00894	0.00886	0.0383	0.0484	0.00916	0.00986	0.501	0.476	2.68	2.16
3	0.00724	0.00906	0.0321	0.0345	0.00718	0.00699	0.559	0.527	2.65	2.83
4	0.00720	0.00743	0.0387	0.0453	0.00744	0.00858	0.421	0.456	2.47	2.53
5	0.00828	0.00897	0.0397	0.0401	0.00883	0.00931	0.507	0.512	2.71	2.58
6	0.00875	0.00891	0.0423	0.0433	0.00949	0.00957	0.487	0.490	2.47	2.48
7	0.00989	0.0105	0.0388	0.0409	0.00919	0.0120	0.451	0.459	2.39	2.63
8	0.00860	0.00858	0.0331	0.0350	0.00742	0.00815	0.494	0.522	2.39	2.08
9	0.00857	0.00976	0.0395	0.0440	0.00889	0.00950	0.468	0.502	2.42	2.35
Spiked level (mg/kg)	0.01		0.05		0.01		0.5		3	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	0.00876		0.0407		0.00890		0.491		2.53	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	87.6		81.4		89.0		98.2		84.4	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	9.3		8.6		10		3.6		6.7	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	11		13		14		6.8		9.1	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		22		22		18		14	
HorRat	0.50		0.61		0.64		0.38		0.65	

a)  $n=18$ 

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 8 Collaborative study for imazapyr

Lab. No.	Feed types									
	Formula feed for finishing beef cattle		Wheat		Corn		Soybean meal		Sudangrass hay	
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
1	0.0403	0.0394	0.0554	0.0380	0.0438	0.0415	5.99	5.85	27.1	29.5
2	0.0418	0.0398	0.0393	0.0456	0.0438	0.0473	6.35	6.06	25.9	25.2
3	0.0280	0.0376	0.0295	0.0323	0.0317	0.0296	6.71	6.50	27.7	29.4
4	0.0257	0.0282	0.0322	0.0414	0.0329	0.0383	3.59 <sup>a)</sup>	3.50 <sup>a)</sup>	27.3	27.5
5	0.0389	0.0415	0.0389	0.0401	0.0418	0.0445	6.82	6.90	27.4	26.9
6	0.0448	0.0445	0.0449	0.0444	0.0467	0.0485	6.17	6.26	28.5	28.3
7	0.0472	0.0484	0.0415	0.0452	0.0464	0.0577	5.74	5.84	25.5	28.2
8	0.0291	0.0311	0.0262	0.0262	0.0300	0.0349	5.99	5.89	28.5	27.0
9	0.0385	0.0447	0.0427	0.0453	0.0447	0.0493	6.37	6.70	25.8	25.8
Spiked level (mg/kg)	0.05		0.05		0.05		7		30	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	0.0383		0.0394		0.0419		6.26		27.3	
Mean recovery <sup>b)</sup> (%)	76.6		78.8		83.7		89.4		91.0	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	7.6		13		8.6		2.2		3.8	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	19		20		19		6.2		4.8	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	22		22		22		12		10	
HorRat	0.85		0.90		0.85		0.51		0.49	

a) Data excluded by Cochran test

b) Formula feed for finishing beef cattle:  $n=18$ ; Wheat:  $n=18$ ; Corn:  $n=18$ ; Soybean meal:  $n=16$ ; Sudangrass hay:  $n=18$

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 9 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC colume
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC Waters	X Bridge C18, Waters
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 5 µm)
2	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 4 µm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: 1200 Series, Agilent Technologies	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: API-3200 Q TRAP, AB SCIEX	(2.1 mm×150 mm, 4 µm)
8	LC: LC-20AD, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: API 4000, Applied Biosystems	(2.1 mm×150 mm, 4 µm)
9	LC: ACQUITY UPLC, Waters	BEH C18, Waters
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 1.7 µm)

#### 4 まとめ

飼料中に残留するイマザピック及びイマザピルについて、JFRL 法を基に、LC-MS/MS を用いた同時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、以下の結果を得られ、適用が可能であると考えられた。

1) 検量線はそれぞれ 0.2~2000 ng/mL (注入量として 0.0008~8 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、イマザピックとして、肉用牛肥育用配合飼料に 0.5 及び 1 ng/mL 相当濃度、小麦に 0.5, 1 及び 5 ng/mL 相当濃度、大豆に 0.5, 5 及び 50 ng/mL 相当濃度、とうもろこしに 0.5 及び 1 ng/mL 相当濃度、大豆油かすに 0.5, 5 及び 50 ng/mL 相当濃度、スーダングラス乾草に 0.5, 5 及び 30 ng/mL 相当濃度、イマザピルとして、肉用牛肥育用配合飼料に 0.5, 1 及び 5 ng/mL 相当濃度、小麦に 0.5, 1 及び 5 ng/mL 相当濃度、大豆に 0.5, 5 及び 500 ng/mL 相当濃度、とうもろこしに 0.5, 1 及び 5 ng/mL 相当濃度、大豆油かすに 0.5, 5 及び 700 ng/mL 相当濃度、スーダングラス乾草に 0.5, 5 及び 300 ng/mL 相当濃度とした。

2) 本法に従って得られた SRM クロマトグラムでは、6 種類の飼料原料及び 3 種類の配合飼料において定量を妨げるピークは認められなかった。

- 3) 肉用牛肥育用配合飼料，小麦，大豆，とうもろこし，大豆油かす及びスーダングラス乾草にイマザピックとして 0.005~3 mg/kg 相当量，イマザピルとして 0.005~30 mg/kg 相当量を添加した試料について添加回収試験を実施し，回収率及び繰返し精度を求めたところ良好な結果が得られた。
- 4) 本法によるイマザピック及びイマザピルの定量下限は 0.005 mg/kg（乾牧草は 0.05 mg/kg），検出下限は 0.002 mg/kg（乾牧草は 0.02 mg/kg）であった。
- 5) 肉用牛肥育用配合飼料にイマザピックとして 0.01 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 0.05 mg/kg 相当量，小麦にイマザピック及びイマザピルとしてそれぞれ 0.05 mg/kg 相当量，とうもろこしにイマザピックとして 0.01 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 0.05 mg/kg 相当量，大豆油かすにイマザピックとして 0.5 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 7 mg/kg 相当量並びにスーダングラス乾草にイマザピックとして 3 mg/kg 相当量及びイマザピルとして 30 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，良好な結果が得られた。

## 謝 辞

共同試験に参加していただいた全国農業協同組合飼料畜産中央研究所，一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び一般財団法人食品環境検査協会東京事業所における関係者各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会：イマザピック農薬評価書（第2版），平成26年1月（2014）。
- 2) 食品安全委員会：イマザピル農薬評価書（第2版），平成26年3月（2014）。
- 3) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和51年7月24日，農林省令第35号（1976）。
- 4) 一般財団法人日本食品分析センター，一般財団法人食品環境検査協会：平成26年度飼料中の有害物質等分析法開発事業（2015）。
- 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) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995).
- 7) AOAC Int. (2012) Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a Method of Analysis. In official methods of analysis of AOAC Int. 19 ed. Gaithersburg, MD, USA.
- 8) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, 125, 385-386 (2000).

### 3 飼料用イネ中のエスプロカルブ他4成分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

吉村 哲史\*, 若宮 洋市\*

#### Simultaneous Determination of Esprocarb and 4 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

Satoshi YOSHIMURA\* and Youichi WAKAMIYA\*

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

An analytical method was developed to simultaneously determine the levels of buprofezin, cafenstrole, esprocarb, pyrazolynate and pyrazoxyfen in feed using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to samples, buprofezin, cafenstrole, esprocarb, pyrazolynate and pyrazoxyfen were extracted with acetone and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The sample solution was purified with InertSep Slim-J C-18B (GL Science Inc.; Tokyo, Japan) and injected into the LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of five pesticides. LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) using a gradient with 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as the mobile phase. MS/MS analysis was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode.

Recovery tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked. Rice straw was spiked with 0.01 or 25 mg/kg of buprofezin, 0.01 or 0.2 mg/kg of other pesticides except buprofezin. Whole-crop rice silage was spiked with 0.01 or 15 mg/kg of buprofezin, 0.01 or 0.2 mg/kg of other pesticides except buprofezin. Paddy rice was spiked with 0.01 or 10 mg/kg of buprofezin, 0.01 or 0.02 mg/kg of cafenstrole and esprocarb, 0.01 or 0.1 mg/kg of pyrazolynate and pyrazoxyfen. The mean recoveries ranged from 85.6 % to 101 % for buprofezin, 93.6 % to 103 % for cafenstrole, 88.5 % to 104 % for esprocarb, 90.3 % to 98.8 % for pyrazolynate and 86.2 % to 106 % for pyrazoxyfen. The relative standard deviations of repeatability (RSD<sub>r</sub>) were not more than 7.1% for buprofezin, 5.2 % for cafenstrole, 7.9 % for esprocarb, 7.1 % for pyrazolynate and 5.9 % for pyrazoxyfen.

A collaborative study was conducted in nine laboratories, using rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked with buprofezin, cafenstrole, esprocarb, pyrazolynate and pyrazoxyfen in the following quantities: 25 mg/kg of buprofezin and 0.2 mg/kg of other pesticides except buprofezin for rice straw, 15 mg/kg of buprofezin and 0.2 mg/kg of other pesticides except buprofezin for whole-crop rice silage, and 10 mg/kg of buprofezin and 0.02 mg/kg of cafenstrole and esprocarb and 0.1 mg/kg of pyrazolynate and pyrazoxyfen for paddy rice. For each pesticide, the resulting range of mean recoveries, repeatability and reproducibility in the terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat, respectively, were 90.5 % to 97.6 % and not more than 4.4 %, 11 % and 1.1 for buprofezin, 95.8 % to 97.0 % and not more than 7.1 %, 9.6 % and 0.46 for cafenstrole, 88.4 to 94.0 % and not more than 8.0 %, 10 % and 0.49 for esprocarb, 91.0 % to 99.3 % and not more than 5.2 %, 15 % and 0.71 for pyrazolynate, and 88.3 % to 94.2 % and not more than 4.0 %, 13 % and 0.65 for pyrazoxyfen.

\* 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

This method was validated and established for use in the inspection of buprofezin, cafenstrole, esprocarb, pyrazolynate and pyrazoxyfen in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed.

**Key words:** buprofezin; cafenstrole; esprocarb; pyrazolynate; pyrazoxyfen; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice for feed; rice straw; whole-crop rice silage; paddy rice; collaborative study

**キーワード:** ブプロフェジン; カフェンストロール; エスプロカルブ; ピラゾリネート; ピラゾキシフェン; 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; 飼料用イネ; 稲わら; 稲発酵粗飼料; 粃米; 共同試験

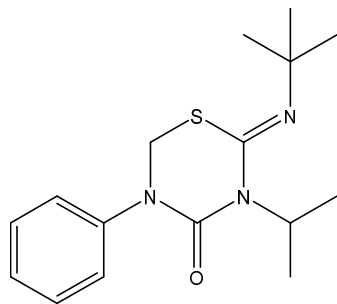
## 1 緒 言

ブプロフェジンはチアジアジン系の殺虫剤として<sup>1)</sup>, カフェンストロールはトリアゾール系の一年生イネ科雑草向け除草剤として<sup>2)</sup>, エスプロカルブはチオカーバメート系除草剤として<sup>3)</sup>, ピラゾリネート及びピラゾキシフェンはピラゾール系水稻用の除草剤として<sup>4), 5)</sup>, 日本国内でそれぞれ農薬登録されている。

我が国では, 飼料の有害物質の指導基準<sup>6)</sup>の改正(平成21年1月29日)により, 飼料用イネ(稲わら, 稲発酵粗飼料及び粃米)について残留農薬の指導基準値が追加設定され, 上記5成分のうちブプロフェジンのみ管理基準値が設定されており, 稲わらで25 mg/kg, 稲発酵粗飼料(以下「WCS」という。)で15 mg/kg 及び粃米で10 mg/kg となっている。その他の農薬については飼料中の基準値は設定されていない。これら農薬の定量法としては, 厚生労働省通知により, ガスクロマトグラフ質量分析計や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。)による試験法<sup>7)</sup>等が示されているが, 飼料に適用できる分析法の開発が急務であった。

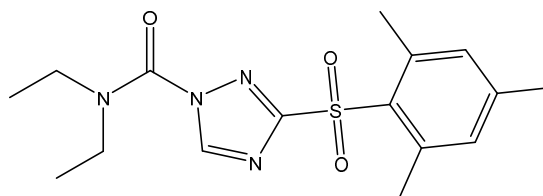
今回, 財団法人日本食品分析センターが, 平成21年度及び平成24年度の飼料中の有害物質等分析法委託事業において開発した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法<sup>8), 9)</sup>(以下「JFRL法」という。)を基に, ブプロフェジン, カフェンストロール, エスプロカルブ, ピラゾリネート及びピラゾキシフェン(以下「ブプロフェジン等」という。)のLC-MS/MSによる同時定量法について, 飼料分析基準<sup>10)</sup>への適用の可否を検討したので, その概要を報告する。

参考にブプロフェジン等の化学構造式等を Fig. 1 に示した。



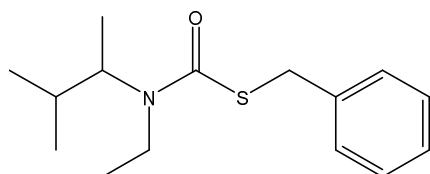
### Buprofezin

2-*tert*-butylimino-3-isopropyl-5-phenyl-  
1,3,5-thiadiazinan-4-one  
 $C_{16}H_{23}N_3OS$  MW : 305.4  
CAS No.: 69327-76-0



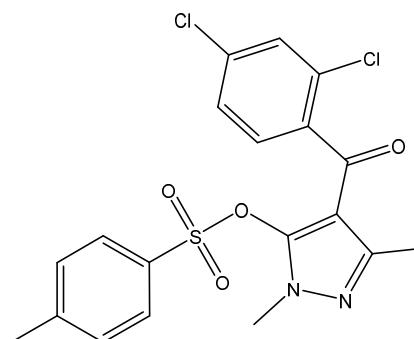
### Cafenstrole

*N,N*-diethyl-3-mesitylsulfonyl-1*H*-1,2,4-  
triazole-1-carboxamide  
 $C_{16}H_{22}N_4O_3S$  MW : 350.4  
CAS No.: 125306-83-4



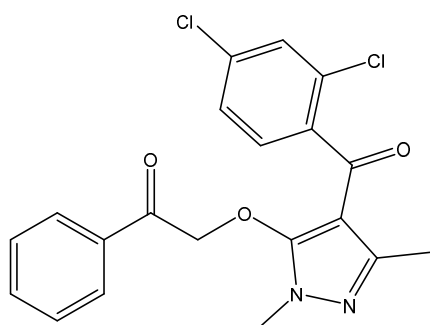
### Esprocarb

*S*-benzyl(*RS*)-1,2-  
dimethylpropyl(ethyl)thiocarbamate  
 $C_{15}H_{23}NOS$  MW : 265.4  
CAS No.: 85785-20-2



### Pyrazolynate

4-(2,4-dichlorobenzoyl)-1,3-  
dimethylpyrazol-5-yl toluene-4-sulfonate  
 $C_{20}H_{16}Cl_2N_2O_3$  MW : 403.3  
CAS No.: 58011-68-0



### Pyrazoxyfen

2-[4-(2,4-dichlorobenzoyl)-1,3-  
dimethylpyrazol-5-yl oxy]acetophenone  
 $C_{20}H_{16}Cl_2N_2O_3$  MW : 403.3  
CAS No.: 71561-11-0

Fig. 1 Chemical structures of buprofezin, cafenstrole, esprocarb, pyrazolynate and pyrazoxyfen

## 2 実験方法

### 2.1 試料

稲わら及び粃米はそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。WCS は 60 °C で 6 時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉碎した。

### 2.2 試薬

1) アセトン, アセトニトリルは残留農薬・PCB 試験用を用いた。水は超純水 (JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。酢酸アンモニウムは試薬特級を用いた。

2) 各農薬標準品

ブプロフェジン, カフェンストロール, エスプロカルブ, ピラゾリネート及びピラゾキシフェンの標準品は, Table 1 に示した供給業者, 純度のものを用いた。

3) 各農薬標準原液

農薬標準品各 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 (これらの液各 1 mL は, 各農薬として 0.5 mg を含有する。)

4) 農薬混合標準液

各農薬標準原液各 1 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し, 更に標線までアセトンを加えて混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, 各農薬としてそれぞれ 10 µg を含有する。)

使用に際して, 混合標準原液の一定量をアセトニトリル-水 (4+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.05, 0.1, 2, 4, 6, 8 及び 10 ng を含有する農薬混合標準液を調製した。

Table 1 Pesticide standards used in this study

Pesticides	Manufacturers	Purity (%)
Buprofezin	Wako Pure Chemical Industries	99.4
Cafenstrole	Wako Pure Chemical Industries	99.6
Esprocarb	Kanto Chemical	99.8
Pyrazolynate	Kanto Chemical	100
Pyrazoxyfen	Kanto Chemical	100

### 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機 : ZM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm) (粃米)
- 2) 乾牧草用粉碎機 : SM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm) (粃米以外)
- 3) 振とう機 : SR-2DW タイテック製 (使用時振動数 280 rpm)
- 4) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム : InertSep Slim-J C18-B (充てん剤量 500 mg) ジーエルサイエンス製にリザーバーを連結したもの
- 5) LC-MS/MS :  
 LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製  
 MS 部 : ACQUITY TQD Waters 製



## 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 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とした。

### 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。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 (3+2) 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 (4+1) 9 mL をミニカラムに加え、各農薬を溶出させた。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 5000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を 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、試料溶液をアセトニトリル-水 (4+1) で 500 倍に希釈した液及び各農薬混合標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (以下「SRM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB C18, Agilent Technologies (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm)
Mobile phase	2 mmol/L Ammonium acetate solution - acetonitrile (4:1) → 15 min → (1:9) (hold for 5 min)→(4:1) (hold for 10 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	120 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (650 L/h, 350 °C)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)
Capillary voltage	3.5 kV

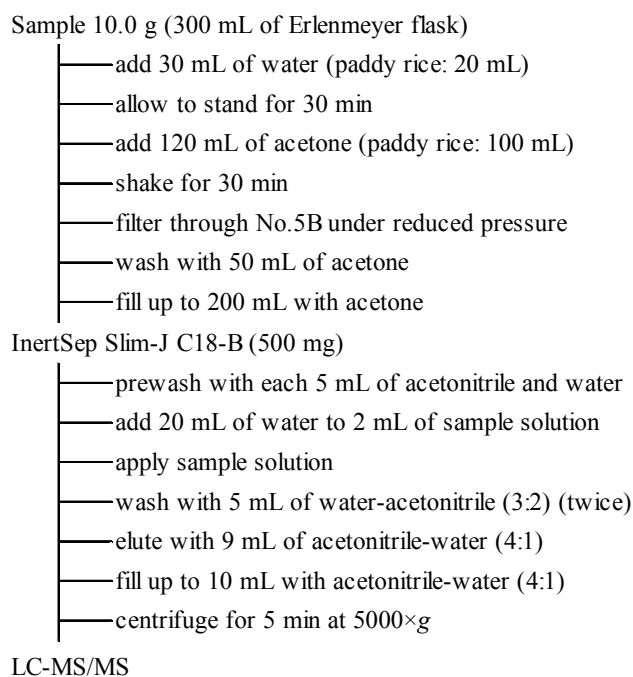
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )		
Buprofezin	306	201	—	35	14
		—	116		18
Cafenstrole	351	100	—	20	16
		—	72		36
Esprocarb	266	91	—	35	25
		—	71		20
Pyrazolynate	439	91	—	45	37
		—	173		19
Pyrazoxyfen	403	91	—	45	35
		—	105		23

## 4) 計 算

得られた SRM 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、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 esprocarb and 4 pesticides in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed

## 3 結果及び考察

## 3.1 検量線

2.2 の 4) に従って調製した各農薬混合標準液各 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さをを用いて検量線を作成した。得られた検量線の一例は、

Fig. 2 のとおりであり、ブプロフェジン等は各 0.05~10 ng/mL (注入量として 0.00025~0.05 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

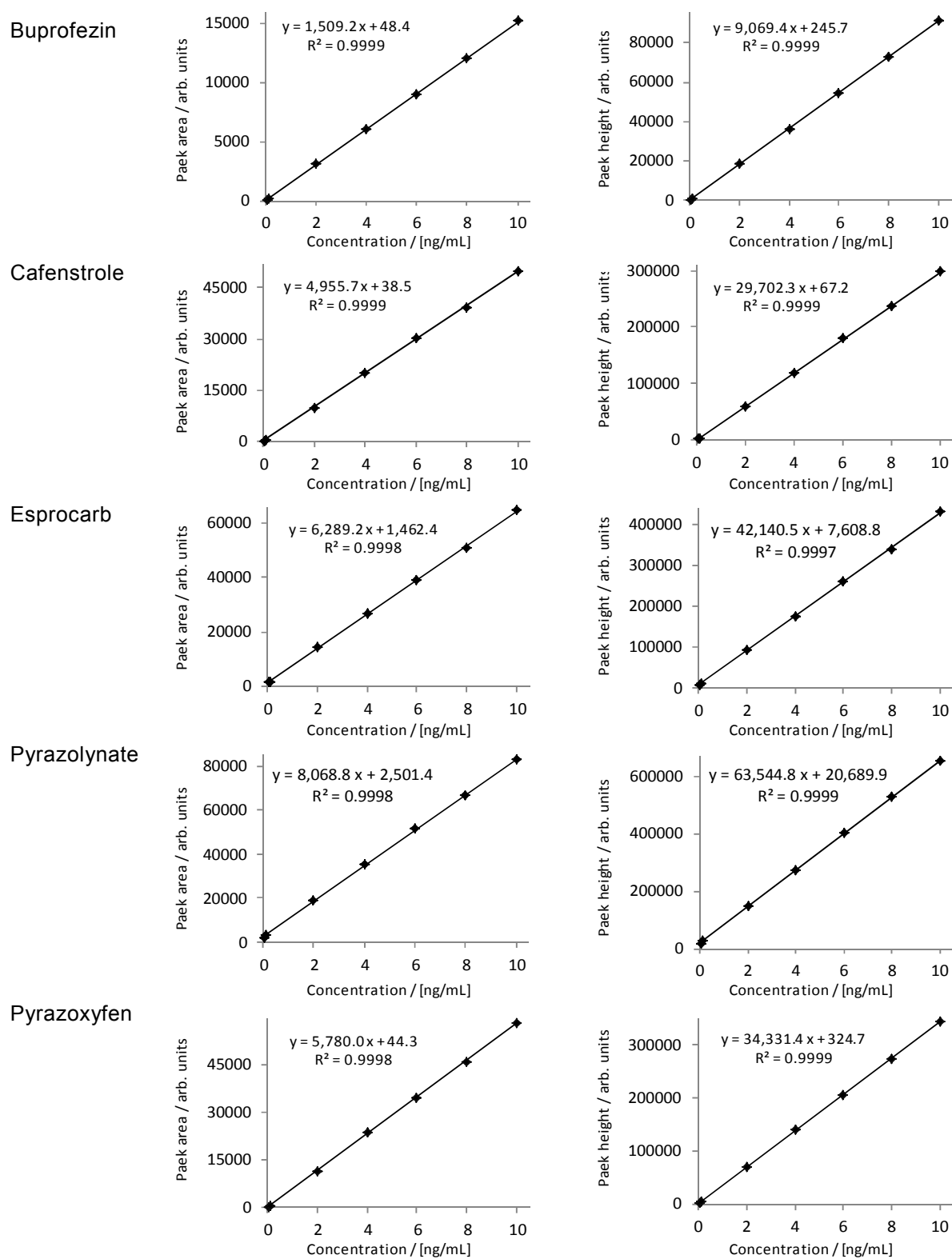


Fig. 2 Calibration curves of buprofezin, cafenstrole, esprocarb, pyrazolynate and pyrazoxyfen by peak area (left) and peak height (right)

### 3.2 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムにおける溶出画分の確認

2.4 の 1)により調製したカラム処理に供する試料溶液にブプロフェジン等として 0.1 mg/kg 相当量を添加（最終試料溶液中で 1 ng/mL 相当量）し、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。その結果は Table 4 のとおりであり、ブプロフェジン等はアセトニトリル-水（4+1）8 mL で全量溶出していた。JFRL 法では 10 mL で溶出させているが、溶出液の受器が 10 mL の全量フラスコであり、標線を超えるおそれがあることから、本法では、アセトニトリル-水（4+1）9 mL で溶出させた後、全量フラスコの標線まで同溶媒を加え LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

Table 4 Elution pattern from InertSep Slim-J C18-B

Feed types	Pesticides	Recovery <sup>a)</sup> (%)				Total
		acetonitrile-water				
		(2:3) 10 mL	(4:1) 0~8 mL	(4:1) 8~9 mL	(4:1) 9~10 mL	
Rice straw	Buprofezin	0	90.4	0	0	90.4
	Cafenstrole	0	97.4	0	0	97.4
	Esprocarb	0	95.8	0	0	95.8
	Pyrazolynate	0	89.0	0	0	89.0
	Pyrazoxyfen	0	101	0	0	101
Whole-crop rice silage	Buprofezin	0	91.3	0	0	91.3
	Cafenstrole	0	102	0	0	102
	Esprocarb	0	99.8	0	0	99.8
	Pyrazolynate	0	102	0	0	102
	Pyrazoxyfen	0	98.6	0	0	98.6
Paddy rice	Buprofezin	0	94.4	0	0	94.4
	Cafenstrole	0	101	0	0	101
	Esprocarb	0	105	0	0	105
	Pyrazolynate	0	96.4	0	0	96.4
	Pyrazoxyfen	0	107	0	0	107

a) Mean ( $n=3$ )

### 3.3 マトリックス効果の確認

4 の 1)及び 2)により調製した稲わら、WCS 及び粳米のブランク試料溶液にブプロフェジン等として 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 1 ng/mL 相当量）をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について、2.2 の 3)に従って調製した同濃度の各標準液に対するピーク面積比を確認したところ、ピーク面積比は 83~109 %であり、各農薬は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

### 3.4 妨害物質の検討

稲わら、WCS 及び粳米各 2 検体を試料として、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、各試料において定量を妨げるピーク

は認められなかった。なお、稲わらにおいてエスプロカルブのピークが認められた。検出したピークは、定量イオンと確認イオンの強度比からエスプロカルブと判断した。

なお、当該稲わらの SRM クロマトグラムを Fig. 3 に示した。

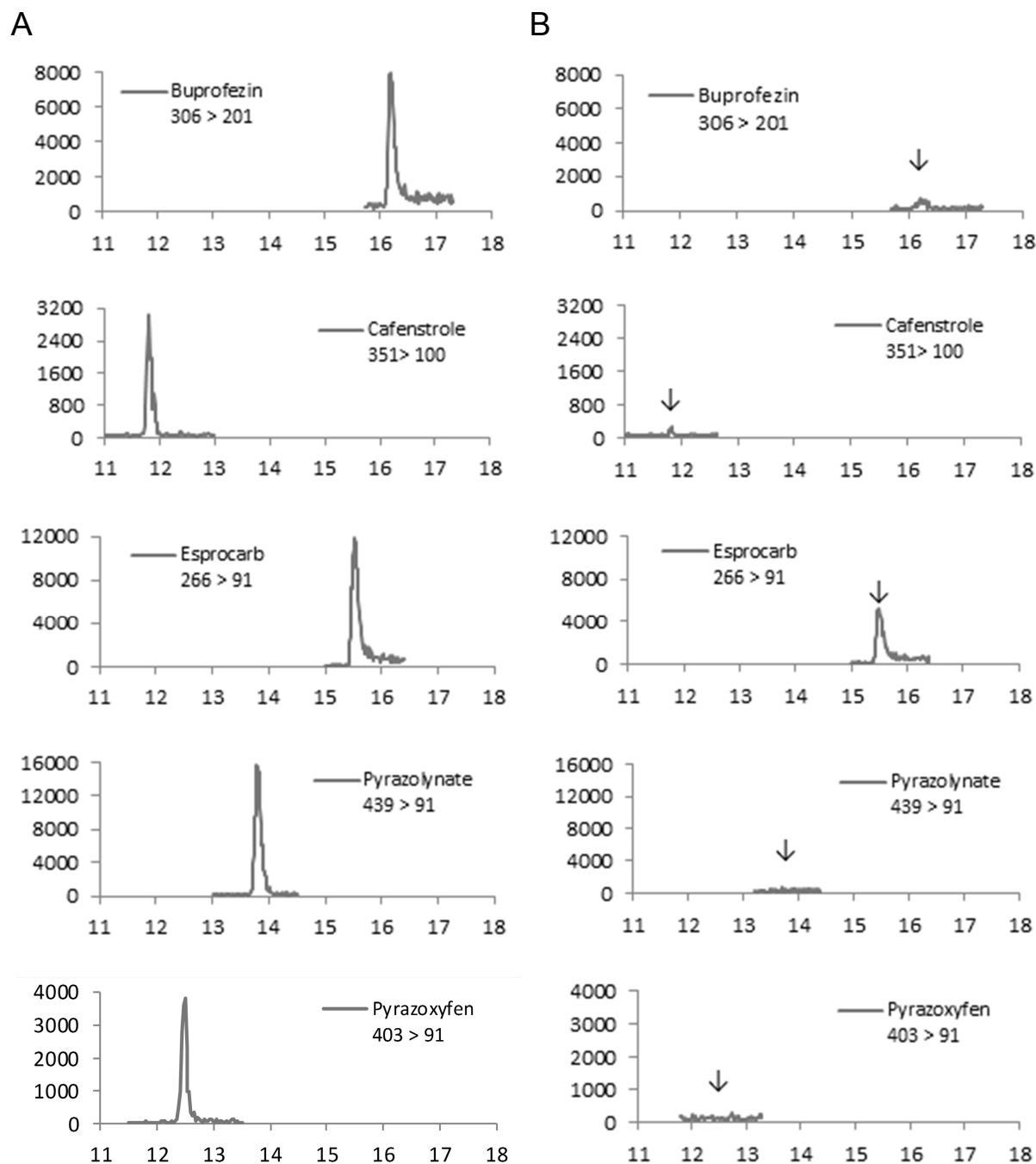


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms of blank rice straw and standard solution (Vertical axis: Intensity (unit: arbitrary units) / Horizontal axis: Retention time (unit: min)) (Arrows indicate the retention time of pesticides.)

A: Standard solution (0.1 ng/mL: 0.0005 ng as each pesticide)

B: Rice straw

### 3.5 添加回収試験

飼料用イネについて、ブプロフェジンとして、稲わらに 0.01 及び 25 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.1 及び 0.5 ng/mL 相当量），WCS に原物中に換算して 0.01 及び 15 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.225 及び 0.675 ng/mL 相当量），粳米に 0.01 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.1 及び 0.2 ng/mL 相当量），カフェンストロール及びエスプロカルブとして、稲わらに 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.1 及び 2 ng/mL 相当量），WCS に原物中に換算して 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.225 及び 4.5 ng/mL 相当量），粳米に 0.01 及び 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.1 及び 0.2 ng/mL 相当量），ピラゾリネート及びピラゾキシフェンとして、稲わらに 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.1 及び 2 ng/mL 相当量），WCS に原物中に換算して 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.225 及び 4.5 ng/mL 相当量），粳米に 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.1 及び 1 ng/mL 相当量），それぞれ添加し，本法に従って添加回収試験を実施し，平均回収率及び繰返し精度を求めた。

また，WCS については原物の水分含有量を 60 %と想定し，原物中濃度への換算は，原物（水分含有量 60 %）中濃度＝風乾物（水分含有量 10 %）中濃度／2.25 の式から求めた。

その結果は Table 5 のとおり，ブプロフェジンについては平均回収率は 85.6~101 %，その繰返し精度は相対標準偏差（ $RSD_r$ ）として 7.1 %以下，カフェンストロールについては平均回収率は 93.6~103 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 5.2 %以下，エスプロカルブについては平均回収率は 88.5~104 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 7.9 %以下，ピラゾリネートについては平均回収率は 90.3~98.8 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 7.1 %以下，ピラゾキシフェンについては平均回収率は 86.2~106 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 5.9 %以下の成績が得られた。

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 5 Recovery for pesticides

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Buprofezin	0.01	90.0	7.1	95.0	1.7	101	3.5
	10	—	—	—	—	99.9	2.4
	15	—	—	85.6	3.6	—	—
	25	99.3	5.2	—	—	—	—
Cafenstrole	0.01	93.6	5.2	98.1	2.4	96.6	3.3
	0.02	—	—	—	—	98.0	4.2
	0.2	94.9	3.1	103	2.1	—	—
Esprocarb	0.01	97.0	4.7	104	1.3	92.4	6.2
	0.02	—	—	—	—	88.5	7.9
	0.2	98.0	4.4	103	1.9	—	—
Pyrazolynate	0.01	97.5	1.8	92.0	7.1	96.7	3.2
	0.1	—	—	—	—	98.8	5.3
	0.2	93.7	3.6	90.3	6.3	—	—
Pyrazoxyfen	0.01	88.3	5.9	97.6	2.0	86.5	1.3
	0.1	—	—	—	—	86.2	5.0
	0.2	92.6	3.1	106	1.2	—	—

—: Not tested

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

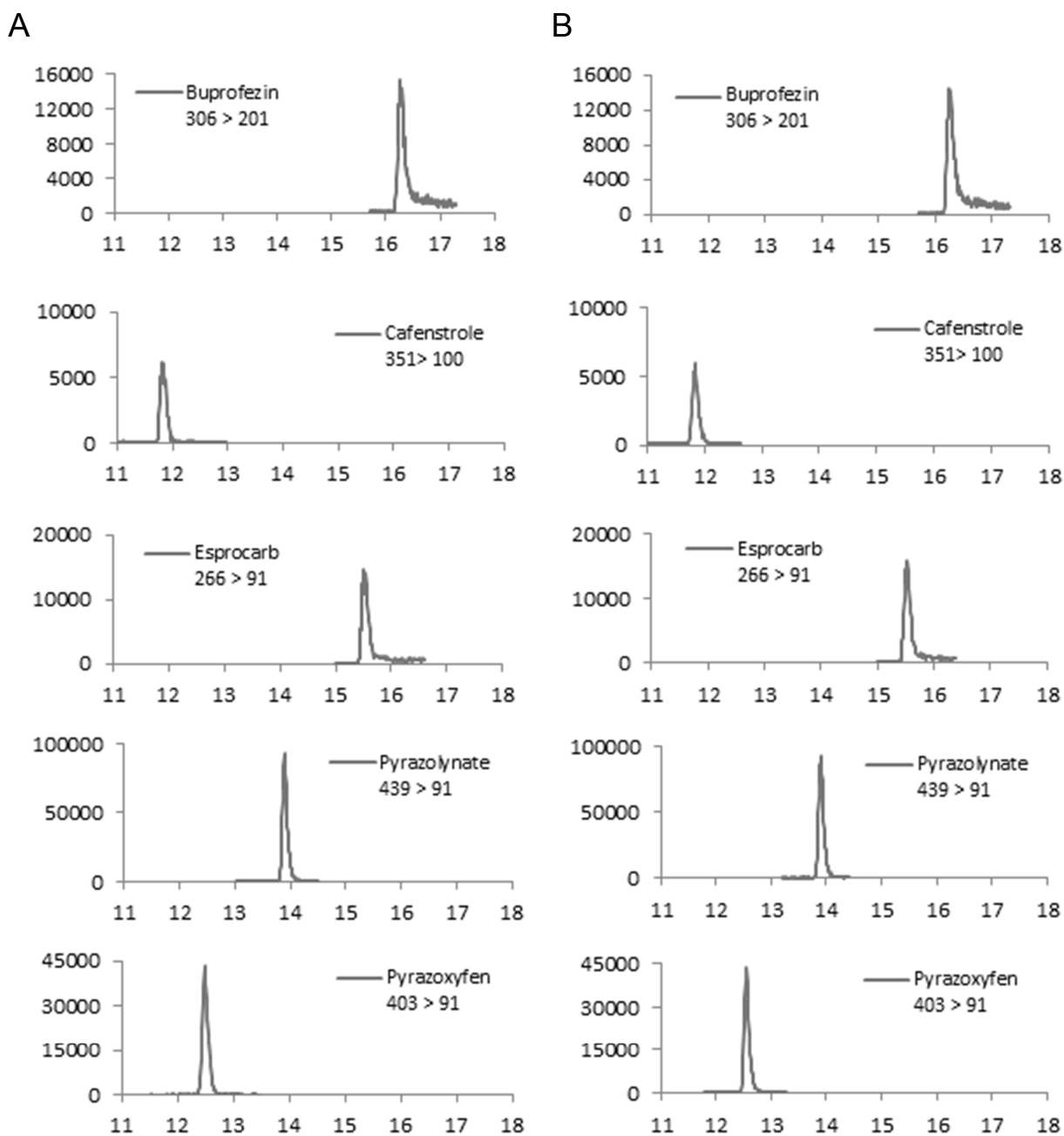


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms of each pesticide  
(Vertical axis: Intensity (unit: arbitrary units) / Horizontal axis: Retention time (unit: min))

A: Standard solution

Buprofezin, cafenstrole and esprocarb (0.2 ng/mL: 0.001 ng as each pesticide)

Pyrazolynate and pyrazoxyfen (1 ng/mL: 0.005 ng as each pesticide)

B: Sample solution of paddy rice

Spiked at 10 mg/kg of buprofezin (0.2 ng/mL as buprofezin)\*, 0.02 mg/kg of cafenstrol and esprocarb (0.2 ng/mL as each pesticide), and 0.1 mg/kg of pyrazolynate and pyrazoxyfen (1 ng/mL as each pesticide)

\* buprofezin: diluted sample solution 500-fold with acetonitrile-water(4:1)



### 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、飼料用イネにブプロフェジン等を添加し、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であり、また、SN比が3となる濃度は0.003 mg/kgであったことから、試料（WCSは風乾物）中の定量下限は0.01 mg/kg、検出下限は0.003 mg/kgであった。

なお、Table 5に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった。

### 3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の2点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、稲わらにブプロフェジンとして25 mg/kg相当量並びにカフェンストロール、エスプロカルブ、ピラゾリネート及びピラゾキシフェンとしてそれぞれ0.2 mg/kg相当量（分析用試料10 gに対して1 mL中にブプロフェジン250 µg並びにカフェンストロール、エスプロカルブ、ピラゾリネート及びピラゾキシフェン各2 µgを含有する混合標準液を1 mL添加）を、WCS（風乾物）にブプロフェジンとして33.75 mg/kg相当量並びにカフェンストロール、エスプロカルブ、ピラゾリネート及びピラゾキシフェンとしてそれぞれ0.45 mg/kg相当量（分析用試料10 gに対して1 mL中にブプロフェジン337.5 µg並びにカフェンストロール、エスプロカルブ、ピラゾリネート及びピラゾキシフェン各4.5 µgを含有する混合標準液を1 mL添加）を、粳米にブプロフェジンとして10 mg/kg相当量、カフェンストロール及びエスプロカルブとしてそれぞれ0.02 mg/kg並びにピラゾリネート及びピラゾキシフェンとしてそれぞれ0.1 mg/kg相当量（分析用試料10 gに対して1 mL中にブプロフェジン100 µg、カフェンストロール及びエスプロカルブ0.2 µg並びにピラゾリネート及びピラゾキシフェン1 µgを含有する混合標準液を1 mL添加）を、それぞれ各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた。

なお、WCSは原物（水分含有量60%）中濃度＝風乾物（水分含有量10%）中濃度／2.25の式で換算した分析値を報告させることとした。

参加試験室は、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般財団法人食品環境検査協会東京事業所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、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）であった。結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>11), 12)</sup>を参考に、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、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度（RSD<sub>f</sub>）及び室間再現精度（RSD<sub>R</sub>）を算出し、得られたRSD<sub>R</sub>から、修正Horwitz式<sup>13)</sup>を用いてHorRatを求めた。

結果はTable 6~10のとおりであった。ブプロフェジンについては稲わら、WCS及び粳米について、平均回収率は90.5、92.4及び97.6%、RSD<sub>f</sub>はそれぞれ2.7、2.9及び4.4%、RSD<sub>R</sub>はそれぞれ10、11及び7.7%、HorRatはそれぞれ1.1、1.0及び0.68であった。カフェンストロールについては稲わら、WCS及び粳米について、平均回収率は96.1、95.8及び97.0%、RSD<sub>f</sub>はそれぞれ2.5、3.0及び7.1%、RSD<sub>R</sub>はそれぞれ9.4、7.7及び9.6%、HorRatはそれぞれ0.46、0.38及び

0.44 であった。エスプロカルブについては稲わら、WCS 及び粃米について、平均回収率は 89.3、88.4 及び 94.0 %、 $RSD_r$  はそれぞれ 4.6、3.3 及び 8.0 %、 $RSD_R$  はそれぞれ 10、7.3 及び 7.1 %、HorRat はそれぞれ 0.49、0.35 及び 0.32 であった。ピラゾリネートについては稲わら、WCS 及び粃米について、平均回収率は 94.1、91.0 及び 99.3 %、 $RSD_r$  はそれぞれ 1.8、5.2 及び 4.5 %、 $RSD_R$  はそれぞれ 15、13 及び 8.8 %、HorRat はそれぞれ 0.71、0.65 及び 0.40 であった。ピラゾキシフェンについては稲わら、WCS 及び粃米について、平均回収率は 88.3、89.3 及び 94.2 %、 $RSD_r$  はそれぞれ 4.0、3.8 及び 3.8 %、 $RSD_R$  はそれぞれ 13、8.9 及び 8.7 %、HorRat はそれぞれ 0.65、0.43 及び 0.40 であった。

なお、一部の結果で HorRat の値が 0.5 を下回るものがあったが、要因の一つとして、本分析法の操作が昨年度共同試験を実施したオキサジクロメホン等の分析法と同一で、比較的簡便であることが考えられた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 11 に示した。

Table 6 Collaborative study for buprofezin

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	22.5	22.8	15.3	13.9	10.6	10.1
2	24.6	23.7	15.0	14.9	9.87	9.79
3	16.4	17.4	10.8	11.0	8.45	8.00
4	23.9	23.7	15.5	15.2	8.97	10.0
5	22.6	21.7	12.6	12.8	9.43	9.18
6	22.3	21.5	12.3	12.4	10.2	9.97
7	24.4	25.0	15.2	15.1	9.89	9.78
8	24.4	22.7	14.4	13.6	11.0	9.76
9	24.0	23.8	14.7	14.9	10.1	10.5
Spiked level (mg/kg)	25		15		10	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	22.6		13.9		9.76	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	90.5		92.4		97.6	
$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	2.7		2.9		4.4	
$RSD_R$ <sup>c)</sup> (%)	10		11		7.7	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	10		11		11	
HorRat	1.1		1.0		0.68	

a)  $n=18$

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 7 Collaborative study for cafenstrole

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.185	0.174	0.191	0.184	0.0176	0.0222
2	0.195	0.198	0.197	0.206	0.0196	0.0183
3	0.149	0.159	0.160	0.162	0.0184	0.0164
4	0.213	0.216	0.215	0.211	0.0225	0.0215
5	0.193	0.189	0.191	0.194	0.0216	0.0196
6	0.204	0.204	0.194	0.196	0.0208	0.0214
7	0.194	0.185	0.197	0.185	0.0183	0.0174
8	0.194	0.191	0.199	0.197	0.0175	0.0183
9	0.203	0.212	0.176	0.193	0.0187	0.0192
Spiked level (mg/kg)	0.2		0.2		0.02	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	0.192		0.192		0.0194	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	96.1		95.8		97.0	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	2.5		3.0		7.1	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	9.4		7.7		9.6	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	21		21		22	
HorRat	0.46		0.38		0.44	

a)  $n=18$ 

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 8 Collaborative study for esprocarb

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.186	0.172	0.182	0.178	0.0168	0.0176
2	0.184	0.183	0.186	0.190	0.0175	0.0185
3	0.134	0.154	0.147	0.155	0.0219	0.0195
4	0.196	0.186	0.192	0.185	0.0191	0.0197
5	0.171	0.170	0.170	0.174	0.0192	0.0172
6	0.181	0.170	0.172	0.169	0.0202	0.0192
7	0.175	0.180	0.184	0.180	0.0179	0.0188
8	0.184	0.171	0.190	0.187	0.0190	0.0176
9	0.201	0.215	0.161	0.181	0.0181	0.0207
Spiked level (mg/kg)	0.2		0.2		0.02	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	0.179		0.177		0.0188	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	89.3		88.4		94.0	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	4.6		3.3		8.0	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	10		7.3		7.1	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	21		21		22	
HorRat	0.49		0.35		0.32	

a)  $n=18$

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 9 Collaborative study for pyrazolynate

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.159	0.156	0.193	0.196	0.102	0.0981
2	0.160	0.161	0.161	0.177	0.0951	0.0936
3	0.144	0.151	0.162	0.147	0.101	0.104
4	0.218	0.217	0.228	0.217	0.113	0.111
5	0.161	0.155	0.147	0.169	0.108	0.0945
6	0.173	0.170	0.181	0.186	0.103	0.103
7	0.144	0.141	0.154	0.171	0.0774	0.0892
8	0.173	0.174	0.186	0.184	0.0935	0.0923
9	0.207	0.200	0.202	0.216	0.104	0.105
Spiked level (mg/kg)	0.2		0.2		0.1	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	0.170		0.182		0.0993	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	94.1		91.0		99.3	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	1.8		5.2		4.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	15		13		8.8	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	21		21		22	
HorRat	0.71		0.65		0.40	

a)  $n=18$ 

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 10 Collaborative study for pyrazoxyfen

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.183	0.159	0.184	0.185	0.0943	0.0934
2	0.158	0.157	0.165	0.169	0.0789	0.0767
3	0.133	0.140	0.147	0.156	0.0970	0.0952
4	0.209	0.206	0.210	0.194	0.108	0.108
5	0.163	0.154	0.170	0.167	0.0952	0.0859
6	0.196	0.186	0.183	0.184	0.0993	0.0937
7	0.179	0.173	0.184	0.181	0.0932	0.100
8	0.187	0.194	0.193	0.195	0.0907	0.0949
9	0.203	0.198	0.163	0.184	0.0924	0.0987
Spiked level (mg/kg)	0.2		0.2		0.1	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	0.177		0.179		0.0942	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	88.3		89.3		94.2	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	4.0		3.8		3.8	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	13		8.9		8.7	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	21		21		22	
HorRat	0.65		0.43		0.40	

a)  $n=18$ 

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 11 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: 1200 Series, Agilent Technologies MS/MS: API-3200, AB Sciex	Inertsil ODS-SP, GL Science (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: LC-20A, Shimadzu MS/MS: API-4000, AB Sciex	Inertsil ODS-SP, GL Science (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro Premier XE, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: 1200Series, Agilent Technologies MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
7	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
8	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
9	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)

#### 4 まとめ

飼料用イネに残留するブプロフェジン等について、JFRL 法を基に、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、カラム処理における溶出溶媒量を 10 mL から 9 mL に変更し、以下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) 検量線は、0.05~10 ng/mL (注入量として 0.00025~0.05 ng) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、ブプロフェジンとして、稲わらに 0.1 及び 0.5 ng/mL 相当濃度、WCS に 0.225 及び 0.675 ng/mL 相当濃度、粳米に 0.1 及び 0.2 ng/mL 相当濃度、カフェンストロール及びエスプロカルブとして、稲わらに 0.1 及び 2 ng/mL 相当濃度、WCS に 0.225 及び 4.5 ng/mL 相当濃度、粳米に 0.1 及び 0.2 ng/mL 相当濃度、ピラゾリネート及びピラゾキシフェンとして、稲わらに 0.1 及び 2 ng/mL 相当濃度、WCS に 0.225 及び 4.5 ng/mL 相当濃度、粳米に 0.1 及び 1 ng/mL 相当濃度とした。

2) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、各農薬は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

3) 飼料用イネについて、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。

- 4) ブプロフェジンとして稲わらに 0.01 及び 25 mg/kg 相当量, WCS (原物中に換算) に 0.01 及び 15 mg/kg 相当量, 粳米に 0.01 及び 10 mg/kg 相当量, カフェンストロール及びエスプロカルブとして稲わら及び WCS (原物中に換算) に 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量, 粳米に 0.01 及び 0.02 mg/kg 相当量, ピラゾリネート及びピラゾキシフェンとして, 稲わら及び WCS (原物中に換算) に 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量, 粳米に 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量をそれぞれ添加し, 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求めたところ良好な結果を得た.
- 5) 本法における各農薬の定量下限は, 試料 (WCS は風乾物) 中で 0.01 mg/kg, 検出下限は 0.003 mg/kg であった.
- 6) 稲わらにブプロフェジンとして 25 mg/kg 相当量, ブプロフェジン以外の各農薬としてそれぞれ 0.2 mg/kg 相当量, WCS (風乾物) にブプロフェジンとして 33.75 mg/kg 相当量, ブプロフェジン以外の各農薬としてそれぞれ 0.45 mg/kg 相当量, 粳米にブプロフェジンとして 10 mg/kg 相当量, カフェンストロール及びエスプロカルブとしてそれぞれ 0.02 mg/kg, ピラゾリネート及びピラゾキシフェンとしてそれぞれ 0.1 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一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所, 一般財団法人食品環境検査協会東京事業所及び全国農業協同組合連合会飼料畜産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) 食品安全委員会: 農薬評価書 ブプロフェジン, 平成 20 年 5 月 (2008)
- 2) 食品安全委員会: 農薬評価書 カフェンストロール, 平成 20 年 2 月 (2008).
- 3) 食品安全委員会: 農薬評価書 エスプロカルブ, 平成 20 年 1 月 (2008).
- 4) 三共株式会社: 三共研年報, 36, 44-92 (1984).
- 5) 日本農薬学会: 日本農薬学会誌, 13, 167-169 (1988).
- 6) 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).
- 7) 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 0124001 号 (2005).
- 8) 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開発委託事業 (2010).
- 9) 財団法人日本食品分析センター: 平成 24 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 (2013).
- 10) 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).
- 11) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, Pure & Appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).



- 
- 12) AOAC Int. (2012) Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. In official methods of analysis of AOAC Int. 19 ed. Gaithersburg, MD, USA.
  - 13) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

## 4 稲わら中のオキシロニック酸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

三井 友紀子<sup>\*1</sup>, 森口 里美<sup>\*2</sup>

### Determination of Oxolinic Acid in Rice Straw by LC-MS/MS

Yukiko MITSUI<sup>\*1</sup> and Satomi MORIGUCHI<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center

<sup>\*2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center  
(Now Kobe Regional Center))

An analytical method was developed to determine the level of oxolinic acid in rice straw using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to the samples, oxolinic acid was extracted with 0.2 w/v% metaphosphoric acid solution-acetonitrile (3:2). The extract was purified with Oasis HLB (Waters Corporation; Milford, MA, USA) and injected into the LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of oxolinic acid. LC separation was carried out on an ODS column (Inertsil ODS-4, 3.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm from GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) using 0.1 v/v% formic acid solution-acetonitrile as the mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on rice straw spiked with oxolinic acid at the levels of 0.6, 1 or 10 mg/kg. The resulting mean recoveries ranged from 89.8 to 92.7 % and the repeatability in terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>) were not more than 6.4 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using two kinds of rice straw spiked with 10 and 2 mg/kg of oxolinic acid, respectively. The mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat, respectively, were 91.9 %, 2.8 %, 5.3 % and 0.46 for rice straw 1, and 97.6 %, 2.5 %, 7.6 % and 0.52 for rice straw 2.

This method was validated and established for use in the inspection of oxolinic acid in rice straw

Key words: oxolinic acid; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice straw; collaborative study

キーワード：オキシロニック酸；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；共同試験

## 1 緒 言

オキシロニック酸（オキシリン酸）は 1976 年に住友化学株式会社により開発されたキノリン骨格を有する殺菌剤（抗菌剤）であり、農薬以外に動物用医薬品としても使用されている<sup>1)</sup>。

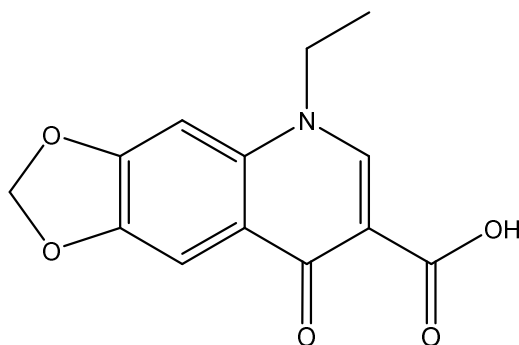
我が国では、飼料の有害物質の指導基準<sup>2)</sup>において、その基準値は、稲わら中で 10 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCS」という。）中で 0.1 mg/kg、粳米中で 3 mg/kg と設定されている<sup>2)</sup>。また、食品では米、野菜、果実、食肉等に残留基準値が定められており、例えば玄米中で 0.3 ppm と設定されている<sup>3)</sup>。

<sup>\*1</sup> 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

<sup>\*2</sup> 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，現 神戸センター

牧野らは、財団法人日本食品分析センターが「平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法開発事業」において開発した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。）を用いた定量法<sup>4)</sup>（以下「JFRL 法」という。）を基に、飼料用イネを対象として飼料分析基準<sup>5)</sup>への適用の可否を検討し、WCS 及び粃米に適用可能な定量法（以下「WCS 法」という。）を確立した<sup>6)</sup>。その際、稲わらについても検討したが、回収率が低い傾向にあり、更なる検討が必要であった<sup>6)</sup>。そこで今回、稲わらを対象としたオキシリニック酸の定量法を、WCS 法を基に検討したのでその概要を報告する。

参考にオキシリニック酸の構造式等を Fig. 1 に示した。



5-ethyl-5,8-dihydro-8-oxo[1,3]dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid

$C_{13}H_{11}NO_5$  MW: 261.2 CAS No.: 14698-29-4

Fig. 1 Chemical structure of oxolinic acid

## 2 実験方法

### 2.1 試料

稲わらは 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。

### 2.2 試薬

1) アセトニトリルは抽出には残留農薬・PCB 試験用を用い、LC-MS/MS 溶離液には液体クロマトグラフ用を用いた。メタノールはカラム処理には残留農薬・PCB 試験用を用い、標準液及び試料溶液調製には液体クロマトグラフ用を用いた。水は超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）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) オキシリニック酸標準液

オキシリニック酸標準品（純度 99.9 %，和光純薬工業製）10 mg を正確に量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、水酸化ナトリウム溶液（0.1 mol/L）1 mL 及び水-メタノール（1+1）約 50 mL を加えた。超音波処理してオキシリニック酸を溶かし、更に標線まで水-メタノール（1+1）を加えてオキシリニック酸標準原液を調製した（この液 1 mL は、オキシリニック酸として 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を、水-メタノール（7+3）で正確に希釈し、1 mL 中にオキシリニック酸としてそれぞれ 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 及び 50 ng を含有する各オキシリニック酸標準液を調製した。

これらの標準原液及び標準液の調製は、遮光した状態で行った。

### 2.3 装置及び器具

- 1) 乾牧草用粉碎機：SM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)
- 2) 振とう機：レシプロシユーカーSR-2W タイテック製 (使用時振動数 300 rpm)
- 3) ガラス繊維ろ紙：GFP-95 桐山製作所製
- 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：Oasis HLB カートリッジ (充てん剤量 200 mg, リザーバー容量 6 mL) Waters 製
- 5) LC-MS/MS :  
LC 部：ACQUITY UPLC System Waters 製  
MS 部：ACQUITY TQD Waters 製

### 2.4 定量方法

定量操作は、遮光した状態で行った。

#### 1) 抽出

分析試料 5 g を正確に量って 300 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL を加え 30 分間静置した後、更に 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) 120 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、抽出液をガラス繊維ろ紙で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線まで 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) を加えた。この液の一定量を 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) で正確に 100 倍希釈した後、希釈試料溶液 4 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 10 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とした。

#### 2) カラム処理

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムをメタノール 10 mL 及び水 10 mL で順次洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、流速 1~2 mL/min 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 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。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 5 mL をミニカラムに加えてオキシソリニック酸を溶出させた。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。水-メタノール (7+3) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5000×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を 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

試料溶液及び各オキシソリニック酸標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (以下「SRM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 及び 2 に示した。

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

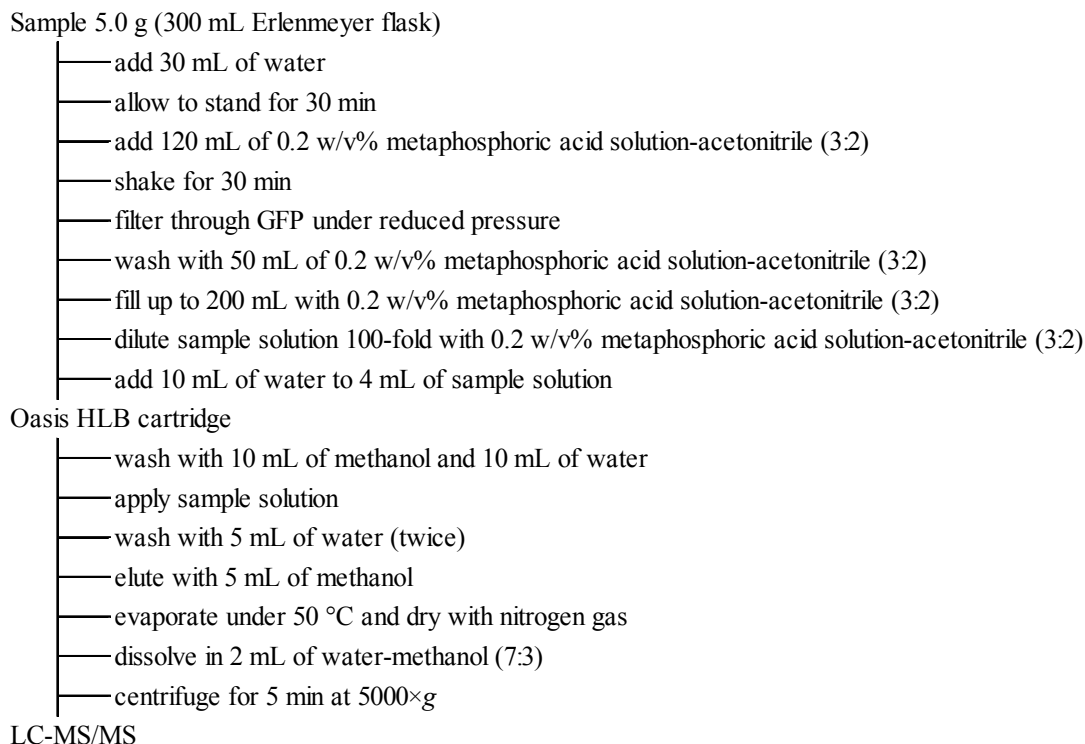
Column	Inertsil ODS-4 (3.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% Formic acid solution - acetonitrile (7:3) (hold for 19 min) → 1 min → (5:95) (hold for 5 min) → 1 min → (7:3) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	120 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (800 L/h, 350 °C)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.20 mL/min)
Capillary voltage	2 kV

**Table 2 MS/MS parameters**

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )		
Oxolinic acid	262	244	—	30	15
		—	216	30	25

#### 4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のオキシリニック酸量を算出した。なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for oxolinic acid in rice straw  
(analyzed under the shading condition)

## 2.5 抽出液の希釈倍率の検討

稲わらについて、WCS 法により調製したブランク試料溶液及び WCS 法において 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) で 10 倍希釈するところを 100 倍希釈とした方法により調製したブランク試料溶液にオキシリニック酸としてそれぞれ 10 mg/kg 相当量を添加したマトリックス標準液について、2.2 の 2)に従って調製した同濃度のオキシリニック酸標準液に対するピーク面積比を確認した。

また、稲わらについてオキシリニック酸としてそれぞれ 10 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、WCS 法及び WCS 法において 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) で 10 倍希釈するところを 100 倍希釈とした方法により定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。

## 2.6 試料採取量の検討方法

稲わら (3 検体) について、それぞれ 2.5, 5.0, 10 及び 15 g を採取し、オキシリニック酸としてそれぞれ 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量) を添加した試料を用いて回収率を求めた。

定量方法は、WCS 法で抽出し、吸引ろ過後、全量フラスコの標線まで 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) を加えて調製した試料溶液について、その一定量を 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) で正確に 100 倍希釈し、以降 WCS 法で定量を行った。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 抽出液の希釈倍率の検討

牧野らが報告した WCS 法では、遮光条件下での操作と抽出液を 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) で定容した液を 10 倍希釈することにより良好な結果が得られたが、稲わらのみ低回収率の傾向になった<sup>6)</sup>。稲わらは、試料溶液を 10 倍希釈するだけでは夾雑成分に由来するイオン化阻害の低減が十分にされていない可能性が考えられたため、更に試料液を希釈することで改善されるかどうか 2.5 によりマトリックスの影響を比較した。

その結果は Table 3 のとおり、稲わらは試料液を同溶媒で 100 倍希釈することにより、稲わら中のオキシリニック酸に対するマトリックスの影響が低減される結果が得られた。

そこで 2.5 により、稲わら (1 検体) にオキシリニック酸として 10 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、10 倍希釈した試料溶液と 100 倍希釈した試料溶液を用いて 3 点併行で定量し、オキシリニック酸の回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は Table 4 のとおり、試料溶液の希釈操作を 100 倍希釈とすることにより、回収率等が改善した。よって、WCS 法の希釈を 10 倍希釈から 100 倍希釈に変更して以降の検討を行うことにした。

Table 3 Matrix effects by different dilution factors

Dilution factor of extract	Matrix factor <sup>a)</sup> (%)	
	run1	run2
10-fold dilution	87.8	93.1
100-fold dilution	103	99.8

a) Response ratio of oxolinic acid calculated as peak area in the presence of matrix component divided by peak area in the pure solution

Table 4 Effects of dilution on recovery tests

Dilution factor of extract	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup>
	(%)	(%)
10-fold dilution	75.1	6.4
100-fold dilution	80.5	2.6

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

#### 3.2 試料採取量の検討

WCS 法では試料採取量を 10 g とし、振とう抽出後に吸引ろ過をして抽出液を得ている。しかし、試料が稲わらの場合、そのろ過後のろ紙上に残る稲わら残さは、籾米残さに比べ 3 倍程度の厚みがあるため、ろ紙上の残さを更に 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) 50 mL で洗浄しても、稲わら残さにオキシリニック酸が残留している可能性も考えられた。そこで 2.6 により、稲わら 3 検体を用いて、稲わらに適する試料採取量の検討を行った。

その結果は Table 5 のとおり、試料採取量が 10 g より少ない方が回収率は高い傾向であった。一方、飼料中の有害物質の定量に際し、対象成分が試料中で偏在する可能性も考慮すると、試料採取量は 2.5 g より 5 g を採用する方が適していると判断し、稲わらでは試料採取量を 5 g とすることにした。

Table 5 Effects of sample weight on recovery tests

Sample weight (g)	Recovery (%) <sup>a)</sup>		
	Rice straw 1	Rice straw 2	Rice straw 3
2.5	83.5	92.1	80.4
5	88.5	91.2	74.8
10	85.7	86.5	65.8
15	75.5	69.2	52.2

a)  $n=1$ 3.3 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

WCS 法ではミニカラム精製時にオキシリニック酸を水-アセトニトリル (4+1) 20 mL で溶出しているが、厚生労働省通知に示されている食品中のオキシリニック酸試験法のうち、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) による畜水産物を対象とした一斉試験法<sup>7)</sup>では、WCS 法と同じ種類のミニカラム (Oasis HLB) を用い、メタノール 5 mL でオキシリニック酸を溶出している<sup>7)</sup>。水-アセトニトリル (4+1) 20 mL による溶出は水を多く含むことから、溶出液の減圧乾固にかなりの時間を要しており、メタノールによる溶出に変えることで分析操作の効率化が見込まれる。メタノール溶出に変えることにより意図しない夾雑物の溶出が懸念されるが、試料採取量を 10 g から 5 g に、抽出液の希釈倍率を 10 倍から 100 倍に変更したことにより、WCS 法で溶出した時より最終試料溶液中のマトリックスは低減していると推察される。以上のことからメタノールを用いた溶出画分の検討を行った。

2.4 の 1)により得られた試料溶液にオキシリニック酸として 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量) を添加し、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を確認した。その結果、Table 6 のとおり、オキシリニック酸はメタノール 0~5 mL で溶出し、その他の画分には溶出は認められなかった。このことから、稲わらではメタノール 5 mL で溶出させることにした。メタノール 5 mL で溶出させることに変更した結果、溶出及び減圧乾固に要する時間が合計で 1 時間程度短縮できた。

Table 6 Elution pattern of oxolinic acid from Oasis HLB

Feed types	Recovery <sup>a)</sup> (%)						Total
	Water		Methanol				
	0~5 mL	5~10 mL	0~5 mL	5~10 mL	10~15 mL	15~20 mL	
Rice straw 1	0	0	99.4	0	0	0	99.4
Rice straw 2	0	0	100	0	0	0	100

a)  $n=1$ 

## 3.4 妨害物質の検討

稲わら 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、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においても定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

## 3.5 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)及び 2)により調製した稲わらのブランク試料溶液にオキシリニック酸として 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量) を添加したマトリックス標準液について、2.2 の 2)に従って



調製した同濃度のオキシリニック酸標準液に対するピーク面積比を確認したところ、ピーク面積比は 98~106 %であり、オキシリニック酸は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

### 3.6 添加回収試験

稲わら（2 検体）にオキシリニック酸としてそれぞれ 0.6, 1 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液で 0.3, 0.5 及び 5 ng/mL 相当量）を添加した試料を用い、本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は Table 7 のとおり、平均回収率及びその繰返し精度は相対標準偏差（RSD<sub>r</sub>）として 89.8~92.7 %及び 6.4 %以下であった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

Table 7 Recoveries for oxolinic acid

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Rice straw 1		Rice straw 2	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
0.6	92.7	3.9	91.0	4.1
1	91.0	6.4	92.7	4.9
10	89.8	3.0	91.3	2.9

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

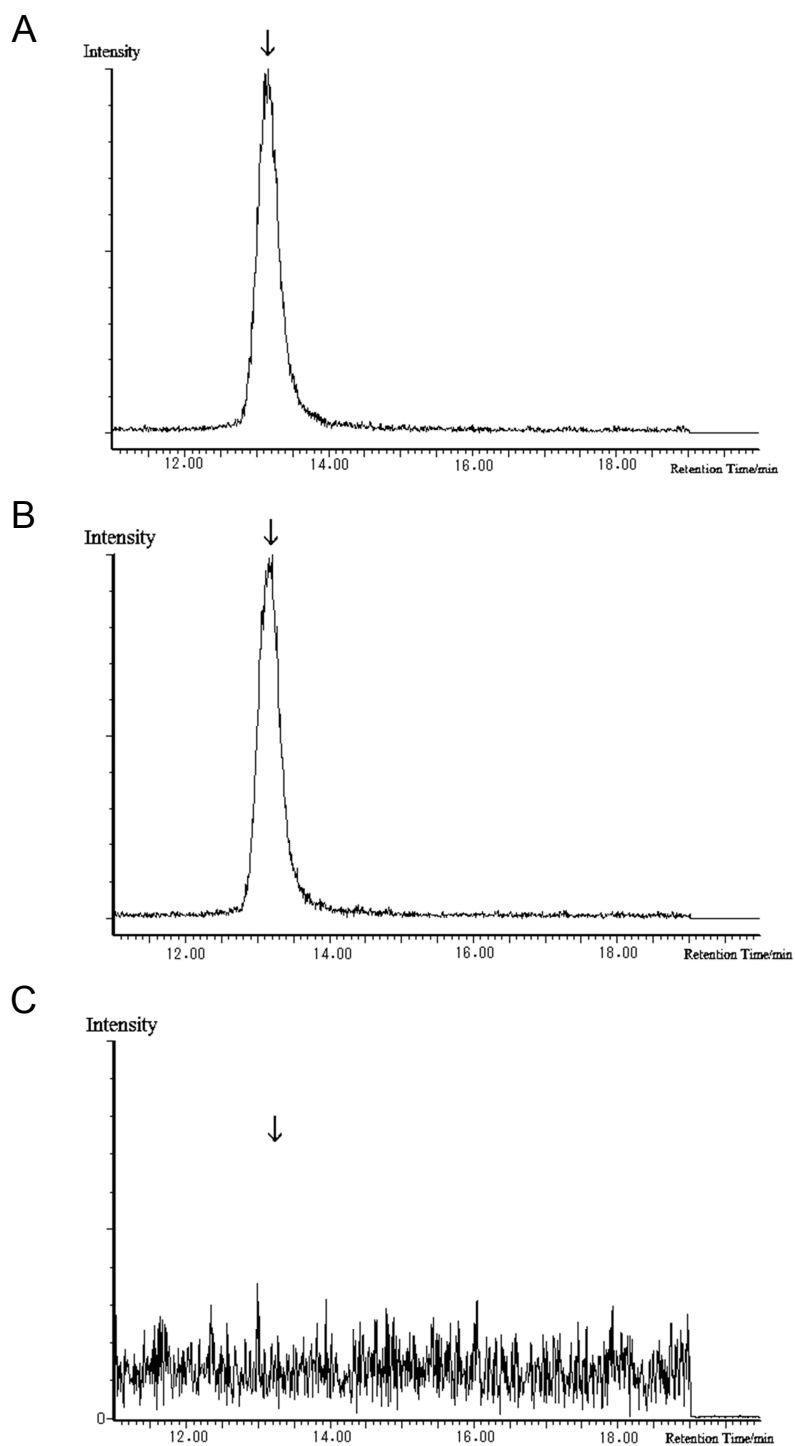


Fig. 2 Selected reaction monitoring chromatograms

(Arrows indicate the retention time of oxolinic acid and each peak is shown as 100 % in each segment except C, in which the peak of the lowest standard solution (0.1 ng/mL) is to be shown as 100 %.)

A: Standard solution (5 ng/mL: 0.025 ng as oxolinic acid)

B: Sample solution of rice straw spiked at 10 mg/kg of oxolinic acid (5 ng/mL as oxolinic acid)

C: Sample solution of rice straw (blank)

### 3.7 定量下限及び検出下限の検討

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、稲わら（2 検体）にオキシリニック酸を添加した添加回収試験により得られたピークの  $SN$  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 0.6 mg/kg,  $SN$  比が 3 となる濃度は 0.2 mg/kg であったことから、本法の定量下限は 0.6 mg/kg, 検出下限は 0.2 mg/kg であった。

### 3.8 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、稲わら 1 にオキシリニック酸として 10 mg/kg 相当量（分析用試料 5 g に対して 1 mL 中に 50  $\mu$ g を含有する標準液 1 mL 添加）及び稲わら 2 にオキシリニック酸として 2 mg/kg 相当量（分析用試料 5 g に対して 1 mL 中に 10  $\mu$ g を含有する標準液 1 mL 添加）を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた。

参加試験室は、フィード・ワン株式会社研究所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所、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）であった。結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>8), 9)</sup>を参考に、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、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度 ( $RSD_r$ ) 及び室間再現精度 ( $RSD_R$ ) を算出し、得られた  $RSD_R$  から、修正 Horwitz 式<sup>10)</sup>を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 8 のとおりであった。稲わら 1 及び稲わら 2 について、平均回収率はそれぞれ 91.9 及び 97.6 %,  $RSD_r$  はそれぞれ 2.8 及び 2.5 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 5.3 及び 7.6 %, HorRat はそれぞれ 0.46 及び 0.52 であった。なお、HorRat が 0.5 を下回っているものがあったが、分析操作が比較的簡便であることが原因ではないかと考えられた。

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 oxolinic acid

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw 1 (mg/kg)		Rice straw 2 (mg/kg)	
1	9.16	9.85	1.83	1.99
2	9.23	9.10	1.81	1.85
3	9.29	9.21	1.88	1.87
4	9.89	9.45	1.95	2.00
5	9.66	9.91	1.94	1.94
6	8.75	8.38	1.70	1.78
7	8.94	8.64	2.15	2.14
8	10.1 <sup>a)</sup>	8.38 <sup>a)</sup>	2.22	2.17
9	8.66	8.91	1.99	1.93
Spiked level (mg/kg)	10		2	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	9.19		1.95	
Mean recovery <sup>b)</sup> (%)	91.9		97.6	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	2.8		2.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	5.3		7.6	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	11		14	
HorRat	0.46		0.52	

a) Data excluded by Cochran test

b) Rice straw 1:  $n=16$ ; Rice straw 2:  $n=18$

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 9 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
2	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
3	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (3.0 mm×150 mm, 3.5 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro premier XE, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
6	LC: Alliance 2695, Waters MS/MS: Quattro premier XE, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
7	LC: 1200 Series, Agilent Technologies MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
8	LC: 1200 Series, Agilent Technologies MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
9	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil ODS-4 HP, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)

#### 4 まとめ

稲わら中に残留するオキシソリニック酸について、WCS 法を基に改良し、稲わらにおける LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否を検討したところ、試料採取量を 5 g に、抽出液の希釈を 100 倍に、ミニカラムからの溶出をメタノール 5 mL で行うことに変更することにより、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 稲わらについて、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 2) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、オキシソリニック酸は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 3) 稲わらにオキシソリニック酸として 0.6, 1 及び 10 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求めたところ良好な結果が得られた。
- 4) 本法のオキシソリニック酸の定量下限は試料中 0.6 mg/kg, 検出下限は 0.2 mg/kg であった。
- 5) 稲わらにオキシソリニック酸として 10 mg/kg 相当量及び 2 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、良好な結果が得られた。

#### 謝 辞

共同試験に参加していただいたフィード・ワン株式会社研究所, 全国農業協同組合連合会飼料畜産中

央研究所，一般財団法人日本食品分析センター彩都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) 食品安全委員会：農薬・動物用医薬品評価書 オキシリニック酸（第3版），平成25年11月（2013）.
- 2) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準の制定について，昭和63年10月14日，63畜B第2050号（1988）.
- 3) 厚生省告示：食品，添加物等の基準規格，昭和34年12月28日，厚生省告示第370号（1959）.
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成22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（2011）.
- 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) 牧野 大作，三井 友紀子，大谷 俊子：稲発酵粗飼料及び粳米中のオキシリニック酸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，**40**，57-70（2015）.
- 7) 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）.
- 8) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 9) AOAC Int. (2012). Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. In official methods of analysis of AOAC Int. 19 ed., Gaithersburg, MD, USA.
- 10) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

## 5 大豆及び大豆油かす中のジカンバ及びDCSA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

小塚 健志<sup>\*1</sup>, 新井 詠子<sup>\*2</sup>, 伊藤 千晶<sup>\*1</sup>, 高橋 亜紀子<sup>\*1</sup>

### Determination of Dicamba and DCSA in Soybean and Soybean Meal by LC-MS/MS

Kenji KOZUKA<sup>\*1</sup>, Eiko ARAI<sup>\*2</sup>, Chiaki ITO<sup>\*1</sup> and Akiko TAKAHASHI<sup>\*1</sup>

(<sup>\*1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

<sup>\*2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department  
(Now Sendai Regional Center))

An analytical method was developed to simultaneously determine the levels of dicamba and 3,6-dichloro-2-hydroxybenzoic acid (DCSA) in soybean and soybean meal using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).

After spiking dicamba-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> and DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> to the samples, and further adding water, dicamba and DCSA were extracted with water-acetonitrile (1:1). The extract was hydrolyzed with hydrochloric acid. The sample solution was purified with liquid-liquid extraction and with Mega Bond Elut C18 (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA), and injected into LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of dicamba and DCSA. LC separation was carried out on a phenyl column (Inertsil Ph, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5µm from GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) using a gradient with 5 mmol/L ammonium acetate solution containing 0.1 % acetic acid and acetonitrile as the mobile phase. In the MS/MS analysis, negative mode electrospray ionization (ESI-) was used.

Recovery tests were conducted on two kinds of soybean and two kinds of soybean meal spiked with 1 mg/kg or 10 mg/kg of dicamba and DCSA. The resulting mean recoveries ranged from 88.3 % to 100 % for dicamba and 86.2 % to 101 % for DCSA, and the repeatability in terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>) were not more than 5.2 % for dicamba and 7.6 % for DCSA.

A collaborative study was conducted in nine laboratories, using soybean spiked with 1 mg/kg of dicamba and 5 mg/kg of DCSA, soybean (heat flaked) spiked with 5 mg/kg of dicamba and 10 mg/kg of DCSA and soybean meal spiked with 10 mg/kg of dicamba and 1 mg/kg of DCSA. For dicamba, the resulting mean recoveries, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat, respectively, were 100 %, 8.2 %, 13 % and 0.80 for soybean, 103 %, 3.1 %, 6.8 % and 0.54 for soybean (heat flaked), and 98.2 %, 4.5 %, 5.1 % and 0.45 for soybean meal. For DCSA, the resulting mean recoveries, RSD<sub>r</sub>, RSD<sub>R</sub> and HorRat, respectively, were 101 %, 5.6 %, 8.6 % and 0.68 for soybean, 100 %, 4.7 %, 7.4 % and 0.65 for soybean (heat flaked), and 103 %, 7.9 %, 11 % and 0.66 for soybean meal.

This method was validated and established for use in the inspection of dicamba and DCSA in soybean and soybean meal.

Key words: dicamba; 3,6-dichloro-2-hydroxybenzoic acid (DCSA); liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); soybean; soybean meal; collaborative study

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

<sup>\*2</sup> 独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 仙台センター

キーワード：ジカンバ；3,6-ジクロロ-2-ヒドロキシ安息香酸（DCSA）；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；大豆；大豆油かす；共同試験

## 1 緒 言

ジカンバは芳香族カルボン酸系の除草剤で、選択性があり広葉雑草に効果がある。オーキシンの様の植物ホルモン作用により、雑草類を枯死させると考えられている<sup>1)</sup>。国内では、ジカンバ、ジカンバカリウム塩、ジカンバメチルアミン塩を有効成分とする農薬が登録されており、芝や樹木、草に適用がある。海外では米国、カナダ、豪州、EU 等において登録があり、麦類、大豆、牧草等に適用がある。ジカンバモノオキシゲナーゼ遺伝子を導入したジカンバ耐性大豆の主要な残留物質は、ジカンバの代謝物質 3,6-ジクロロ-2-ヒドロキシ安息香酸（以下「DCSA」という。）である<sup>1)</sup>。

飼料中のジカンバの残留基準値<sup>2)</sup>は、食品安全委員会によるジカンバについての食品健康影響評価が行われたこと及び関連企業からインポートトレランスの設定が申請されたことから、平成 27 年 7 月に Table 1 のとおり改正について公布され、大豆を除く穀類及び牧草については同日施行され、大豆及び大豆油かすについては平成 28 年 1 月 27 日付け施行され新たに設定された。また、大豆及び大豆油かすにおけるジカンバの残留基準値は、ジカンバ、DCSA をジカンバ含量に換算したものと及び DCSA の抱合体をジカンバ含量に換算したものの総和とされた<sup>3)</sup>。飼料分析基準<sup>4)</sup>には、飼料中のジカンバの分析法としてガスクロマトグラフによる単成分分析法が記載されているが、この方法は DCSA を分析対象としていない。

今回、一般財団法人日本食品分析センター及び一般財団法人食品環境検査協会が「平成 25 年度飼料中の有害物質等分析法開発事業」において開発したジカンバ及び DCSA の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。）による同時定量法<sup>5)</sup>（以下「JFRL 法」という。）を基に、飼料分析基準への適用の可否を検討したのでその概要を報告する。なお、JFRL 法は、ジカンバ耐性遺伝子組換えダイズの開発企業が開発した大豆製品中のジカンバ及び DCSA（抱合体を含む。）の定量法<sup>6)</sup>を参考にした方法である。

参考に、ジカンバ及び DCSA の構造式等を Fig. 1 に示した。

Table 1 Maximum residual limit of dicamba in feeds

Feed types	Maximum residual limits (mg/kg)	
	After revision	Before revision
Barley	7	0.5
Corn	0.5	0.5
Milo	4	3
Oats	3	3
Rye	0.1	0.1
Soybean	10*	—
Soybean meal	10*	—
Wheat	2	0.5
Grass	200	200

\* As total of dicamba, DCSA and glucuronide of DCSA



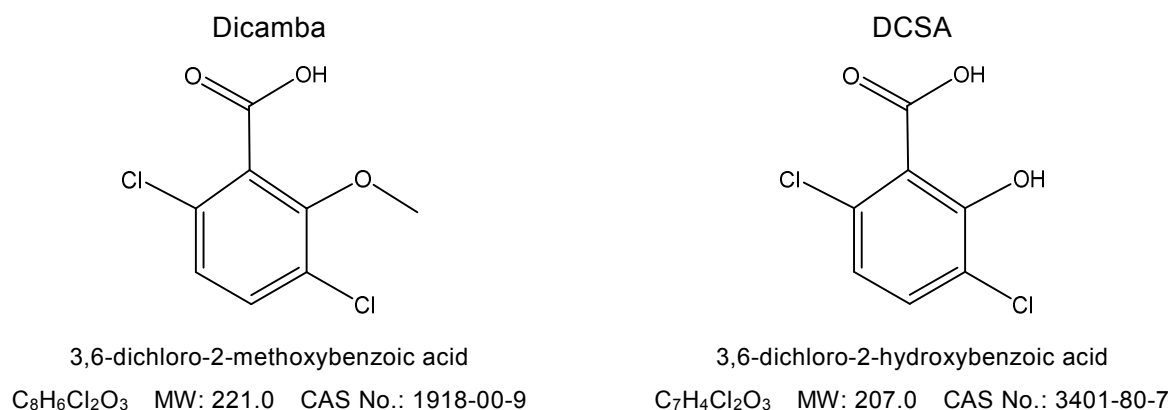


Fig. 1 Chemical structures of dicamba and 3,6-dichlorosalicylic acid (DCSA)

## 2 実験方法

### 2.1 試料

大豆, 大豆 (加熱圧ぺん), 大豆油かす及び大豆油かす (エクストルーダー処理) をそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。

### 2.2 試薬

1) アセトニトリルは, 抽出には残留農薬・PCB 試験用, LC-MS/MS の溶離液には LC/MS 用, 酢酸は LC/MS 用, 酢酸アンモニウム溶液は 1 mol/L HPLC 用, 塩化ナトリウム, ジエチルエーテル及びメタノールは残留農薬・PCB 試験用, その他の試薬は特級 (ギ酸は 98 % 以上のもの) を用いた。ケイソウ土は Celite 545 (Imerys Minerals California, Inc. 製) を用いた。水は超純水 (JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。

#### 2) ジカンバ標準原液

ジカンバ標準品 (純度 98 %, 和光純薬工業製) 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, 更に標線までメタノールを加えてジカンバ標準原液を調製した (この液 1 mL は, ジカンバとして 0.5 mg を含有する。 ) 。

#### 3) DCSA 標準原液

DCSA 標準品 (純度 98 %, AK Scientific 製) 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, 更に標線までメタノールを加えて DCSA 標準原液を調製した (この液 1 mL は, DCSA として 0.5 mg を含有する。 ) 。

#### 4) 安定同位体元素標識ジカンバ (ジカンバ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) 内標準原液

安定同位体元素標識ジカンバ (ジカンバ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) 標準品 (純度 98 %, 大陽日酸製) 10 mg を正確に量って 20 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カンバ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 内標準原液を調製した (この液 1 mL は, ジカンバ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> として 0.5 mg を含有する。 ) 。

#### 5) 安定同位体元素標識 DCSA (DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) 内標準原液

安定同位体元素標識 DCSA (DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) 標準品 (純度 98 %, 大陽日酸製) 10 mg を正確に量って 20 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 DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 内標準原液を調製した (この液 1 mL は, DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> として 0.5 mg を含有する。 ) 。

## 6) 混合内標準液

ジカンバ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>内標準原液及び DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>内標準原液各 1 mL を 25 mL の全量フラスコに入れ、標線までメタノールを加えて混合内標準液を調製した（この液 1 mL は、ジカンバ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>及び DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>を 20 µg を含有する。）。

## 7) 混合標準液

使用に際して、ジカンバ標準原液、DCSA 標準原液、ジカンバ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>内標準原液及び DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>内標準原液の一定量を 0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にジカンバとして 10, 20, 50, 100, 150 及び 200 ng, DCSA として 1, 2, 5, 10, 15 及び 20 ng を含有し、かつジカンバ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>として 20 ng, DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>として 2 ng を含有する各検量線作成用混合標準液を調製した。

## 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン、使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）
- 3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：Mega Bond Elut C18 カートリッジ（充てん剤量 1 g, 粒径 40 µm, リザーバー容量 6 mL）Agilent Technologies 製
- 4) LC-MS/MS：  
LC-MS/MS 1 LC 部：ACQUITY UPLC Waters 製  
MS/MS 部：Xevo TQD Waters 製  
LC-MS/MS 2 LC 部：Nexera X2 島津製作所製  
MS/MS 部：LCMS-8040 島津製作所製

## 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、混合内標準液 1 mL を正確に加え、更に水 20 mL を加え、30 分間静置した後、更に水-アセトニトリル (1+1) 80 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1500×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を加水分解に供する試料溶液とした。

## 2) 加水分解

試料溶液 10 mL を 100 mL の共栓遠心沈殿管に正確に入れ、塩酸 (27+170) 20 mL を加え、密栓して 95 °C の油浴で 1 時間加温した後放冷し、1500×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を液液分配に供する試料溶液とした。

## 3) 液液分配

試料溶液 3 mL をあらかじめ塩化ナトリウム溶液 (10 w/v%) 20 mL を入れた 100 mL の分液漏斗 A に正確に加え、更にジエチルエーテル 20 mL を加えて 5 分間振り混ぜた後静置した。水層（下層）を 100 mL の分液漏斗 B に入れ、ジエチルエーテル層（上層）を 100 mL のなす形フラスコに入れた。分液漏斗 A をジエチルエーテル 20 mL で洗浄し、洗液を分液漏斗 B に加え、5 分間振り混ぜた後静置した。水層を捨て、ジエチルエーテル層を先のなす形フラスコに合わせて、40 °C 以下の水浴で減圧濃縮し、窒素ガスを送ってジエチルエーテルを除去した。0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (4+1) 5 mL を残留物に加えて溶かし、カラム処理に供する試料溶液とした。

## 4) 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メタノール 10 mL 及び 0.1 v/v%ギ酸溶液 10 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。試料溶液の入っていたなす形フラスコを 0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (4+1) 5 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加え、同様に流出させた。10 mL の試験管をミニカラムの下に置き、0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (1+1) 10 mL をミニカラムに加え、流速 1 mL/min 程度で吸引してジカンバ及び DCSA を溶出させて、LC-MS/MS によるジカンバの測定に供する試料溶液（以下「試料溶液 I」という。）とした。

試料溶液 I 2mL を 20 mL の全量フラスコに正確に入れ、0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (1+1) を全量フラスコの標線まで加え、LC-MS/MS による DCSA の測定に供する試料溶液（以下「試料溶液 II」という。）とした。

## 5) LC-MS/MS による測定

各試料溶液及び各混合標準液各 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出（以下「SRM」という。）クロマトグラムを得た。この測定は 2.3 の 4) の LC-MS/MS 1 を用い、Table 2 及び Table 3 の測定条件で行った。

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Inertsil Ph (2.1 mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% acetic acid, 5 mmol/L ammonium acetate solution - methanol (19:1) → 2 min → (7:3) (hold for 8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Source temperature	150 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (800 L/h, 400 °C)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.4 Pa)
Capillary voltage	0.6 kV

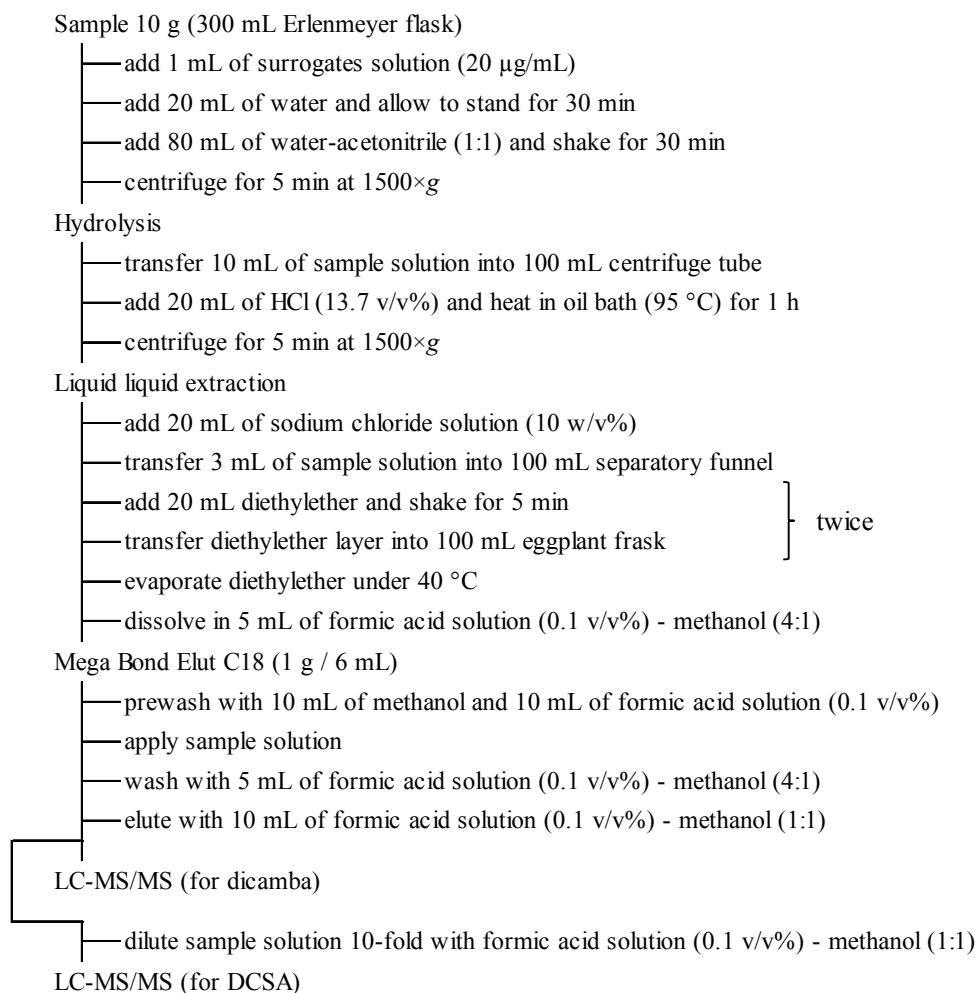
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )		
Dicamba	219	175	—	20	6
		—	145		10
Dicamba- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	225	181	—	26	6
DCSA	205	161	—		12
		—	125	20	
DCSA- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	211	167	—	12	

## 6) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからジカンバ, DCSA, ジカンバ- $^{13}\text{C}_6$  及び DCSA- $^{13}\text{C}_6$  のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し, 試料中のジカンバ及び DCSA のそれぞれの量を算出した.

なお, 定量法の概要を Scheme 1 に示した.



Scheme 1 Analytical procedure for determination of dicamba and DCSA in soybean and soybean meal

## 2.5 内標準物質を用いない方法の検討

内標準物質を用いない JFRL 法を基に予備的な検討を行った.

## 1) 定量方法

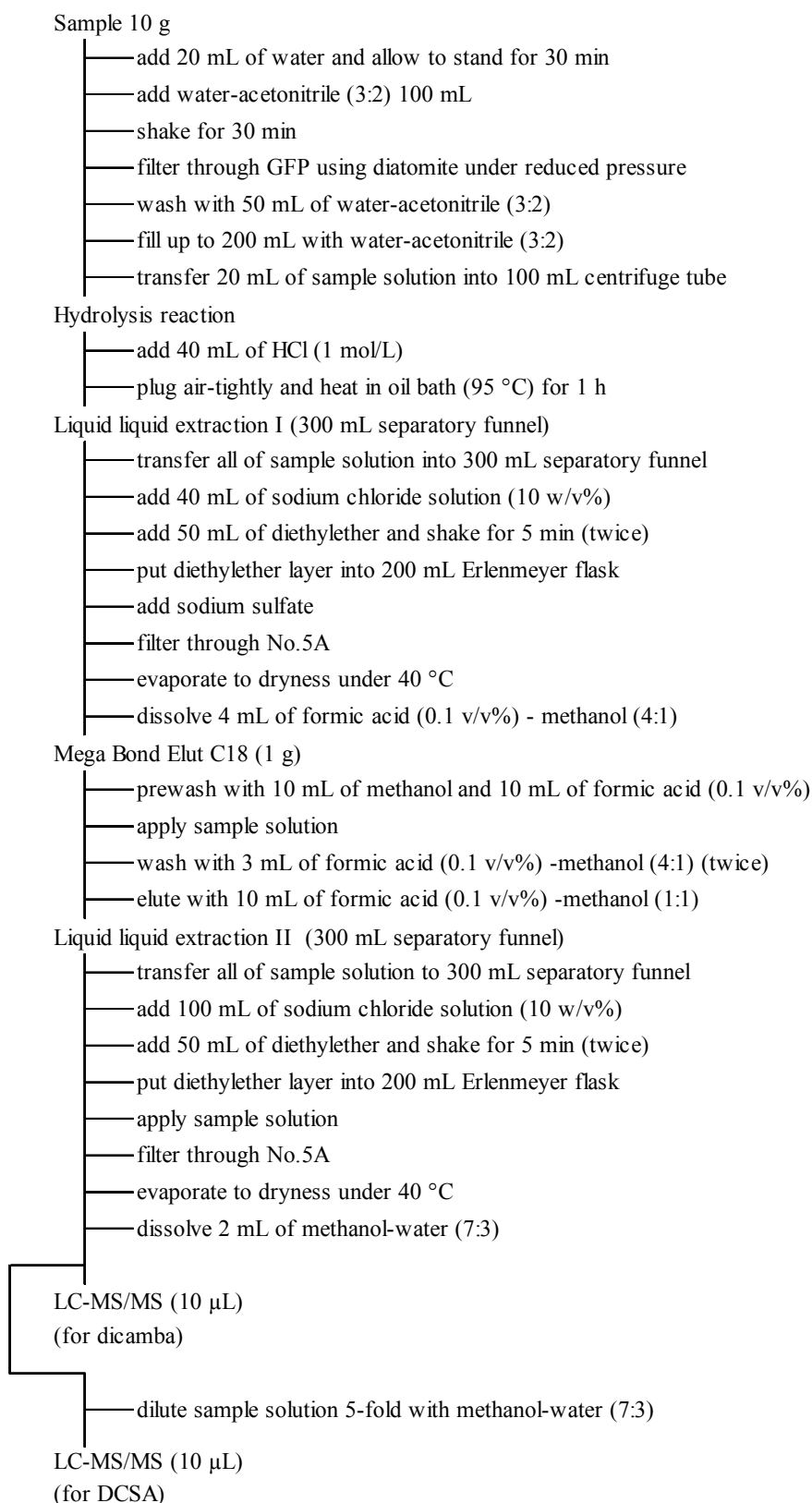
方法は, LC-MS/MS に注入する試料溶液及び標準溶液の溶媒のみ, JFRL 法の希釈溶媒をメタノールからメタノール-水 (7+3) に変更した JFRL 法を基にした Scheme 2 に示す方法で行った. この測定は 2.3 の 4) の LC-MS/MS 2 を用い, Table 4 及び Table 5 の測定条件で行った.

Table 4 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Inertsil Ph (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% acetic acid, 5 mmol/L ammonium acetate solution - methanol (19:1) → 2 min → (7:3) (hold for 8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (3 L/min)
Drying gas	N <sub>2</sub> (15 L/min)
Collision gas	Ar (230 kPa)
Source temperature	200 °C
Heat block temperature	500 °C

Table 5 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )	
Dicamba	219	175	—	7
		—	145	6
	221	—	177	14
DCSA	207	163	—	11
	205	—	161	12



Scheme 2 Analytical procedure for determination of dicamba and DCSA in soybean and soybean meal (without using internal standards)

## 2) 内標準物質を用いない方法による予備的添加回収試験

大豆, 大豆 (加熱圧ぺん), 大豆油かす及び大豆油かす (エクストルーダー処理) にジカンバ及び DCSA として各 0.02, 0.4 及び 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中でジカンバとして 10, 200 及び 200 (希釈溶媒で 25 倍希釈) ng/mL 相当量並びに DCSA として 2, 40 及び 40 (希釈溶媒で 25 倍希釈) ng/mL 相当量) を添加した各試料を 2.5.1 により 3 点併行で定量し, 回収率及び繰返し精度を求めた.

## 3 結果及び考察

### 3.1 内標準物質を用いない方法における予備検討

JFRL 法で得られた SRM クロマトグラムでは, ジカンバのピークに肩が生じ良好なピーク形状が得られなかったため, 内標準物質を用いない方法においては, 希釈溶媒を JFRL 法のメタノールからメタノール-水 (7+3) とした.

2.5 の 2) に従い予備的に添加回収試験を実施した結果は, Table 6 のとおりであった. 基準値に相当する 10 mg/kg では, ジカンバ及び DCSA の平均回収率は, 71.5~88.4 %, その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 8.0 % 以下の良好な結果が得られたが, 低濃度添加では DCSA は回収率が高くなる傾向が認められた. 一方, 大豆中のジカンバについては回収率が低くなる傾向が認められた.

2.5 の 1) により調製した大豆及び大豆油かすの試料溶液にジカンバ及び DCSA として 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中でジカンバとして 100 ng/mL 相当量及び DCSA として 20 ng/mL) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について, 同濃度のジカンバ及び DCSA 標準液に対するピーク面積比を確認したところ, ピーク面積比は大豆及び大豆油かす中のジカンバにおいて 111 及び 133 %, DCSA において 97.4 及び 215 % であり, 回収率が高くなる要因としてマトリックス効果が考えられた.

大豆中のジカンバの回収率が低くなったことについては, 大豆については他の試料と異なり, 抽出の際, 吸引ろ過に 1 点 1 時間 30 分以上要したこと, 液液分配の際に大量のエマルジョンが生じジェチルエーテル層の分離が困難であったことなどから, 定量操作中のロスが要因と考えられた.

JFRL 法の開発の際参考とされた方法<sup>6)</sup>では, 安定同位体元素標識内標準物質 (ジカンバ- $^{13}C_6$  及び DCSA- $^{13}C_6$ ) が用いられていたため, マトリックス効果及び定量操作によるロスを補正することを目的として内標準物質を用いることとした. このことから, 吸引ろ過で行っていた抽出操作における固液分離を遠心分離で行い, 更に, 改正後の大豆及び大豆油かすの残留基準値は 10 mg/kg と比較的高く, 低濃度まで測定する必要性が低いこともあって, JFRL 法で行っていた 2 回目の液液分配による濃縮工程を省略し, ミニカラムの溶出液をそのまま LC-MS/MS の測定に供する試料溶液とする方法を検討した.

Table 6 Recovery tests for dicamba and DCSA without using surrogates

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types							
		Soybean		Soybean (heat flaked)		Soybean meal		Soybean meal (extruded)	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Dicamba	0.02	66.5	2.7	141	15	77.8	2.7	165	8.0
	0.4	64.0	6.2	90.8	7.5	73.7	4.7	116	3.4
	10	73.2	6.4	85.5	2.4	86.4	2.7	71.5	1.7
DCSA	0.02	242	4.2	220	5.2	210	22	282	14
	0.4	87.0	12	99.0	8.2	113	4.4	149	5.8
	10	75.1	8.0	85.9	1.5	88.4	2.0	75.5	0.8

Colored cells stand for recoveries of less than 70 % or more than 120 %

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.2 検量線

2.5 の内標準物質を用いない方法の検討では、2.3 の 4)の LC-MS/MS 2 を用いた測定により、ジカンバで 5~250 ng/mL を 10  $\mu$ L 注入（注入量として 0.05~2.5 ng 相当量）、DCSA で 1~50 ng/mL を 10  $\mu$ L 注入（注入量として 0.01~0.5 ng 相当量）した範囲で直線性を示していた。しかし、機種を換えて 2.3 の 4)の LC-MS/MS 1 を用いて測定したところ、ジカンバで 10~500 ng/mL を 10  $\mu$ L 注入（注入量として 0.1~5.0 ng 相当量）、DCSA で 1~50 ng/mL を 10  $\mu$ L 注入（注入量として 0.01~0.5 ng 相当量）した範囲で良好な直線性が得られなかった。このことは注入量を減らすことで改善が見られたため、ジカンバで 200 ng/mL を 5  $\mu$ L（注入量として 1 ng 相当量）、DCSA で 20 ng/mL を 5  $\mu$ L（注入量として 0.1 ng 相当量）以下の注入量に変更した。

また、ミニカラムの溶出液をそのまま LC-MS/MS の測定に供するために、ジカンバ及び DCSA の希釈溶媒を 0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (1+1) として LC-MS/MS で測定したところ、良好なピーク形状であることが確認できたため希釈溶媒は同溶媒とした。

2.2 の 7)に従って調製した混合標準液各 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成した。その結果、Fig. 2 のとおり、ジカンバで 10~200 ng/mL（注入量として 0.05~1 ng 相当量）、DCSA で 1~20 ng/mL（注入量として 0.005~0.1 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。



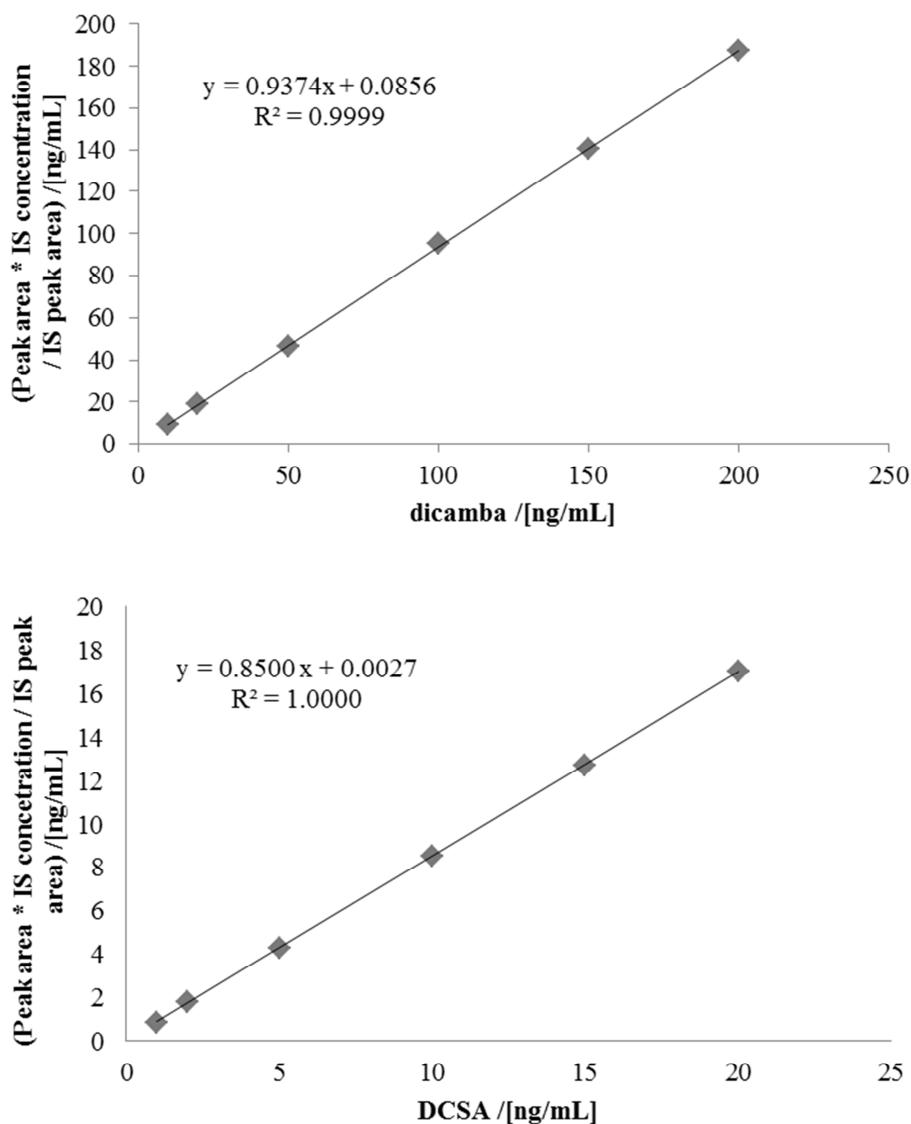


Fig. 2 Internal standard calibration curves of dicamba and DCSA by peak area

### 3.3 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の確認

大豆及び大豆油かすを用い、混合内標準液を加えずに 2.4 に従い調製して途中 3)で窒素ガスを送ってジエチルエーテルを除去した残留物を、ジカンバとして 300 ng 及び DCSA として 30 ng を含有する 0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (4+1) 5 mL で溶かして試料溶液とし、2.4 の 4)に従いオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに入れてミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果、Table 7 のとおり、ジカンバ及び DCSA は 0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (1+1) 3~9 mL の画分で溶出することが確認された。このことから、JFRL 法と同様 0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (1+1) 10 mL で溶出させることとした。

Table 7 Elution patterns of dicamba and DCSA from Mega Bond Elut C18

Fraction		Formic acid solution (0.1 v/v%) - methanol (4:1)		Formic acid solution (0.1 v/v%) - methanol (1:1)				Total
		Load	Wash	Elution				
		0~5 mL	5~10 mL	0~3 mL	3~6 mL	6~9 mL	9~12 mL	
Only standard solution		0	0	0	75	31	0	106
Recovery of dicamba <sup>a)</sup>	In the presence of matrix components of soybean	0	0	0	64	27	0	90
	(%) In the presence of matrix components of soybean meal	0	0	0	53	45	0	98
Only standard solution		0	0	0	99	3	0	102
Recovery of DCSA <sup>a)</sup>	In the presence of matrix components of soybean	0	0	0	112	2	0	114
	(%) In the presence of matrix components of soybean meal	0	0	0	112	3	0	116

a)  $n=1$ 

## 3.4 妨害物質の検討

大豆 4 検体及び大豆油かす 4 検体を用い、混合内標準液の添加は行わず、2.4 に従って調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においても定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

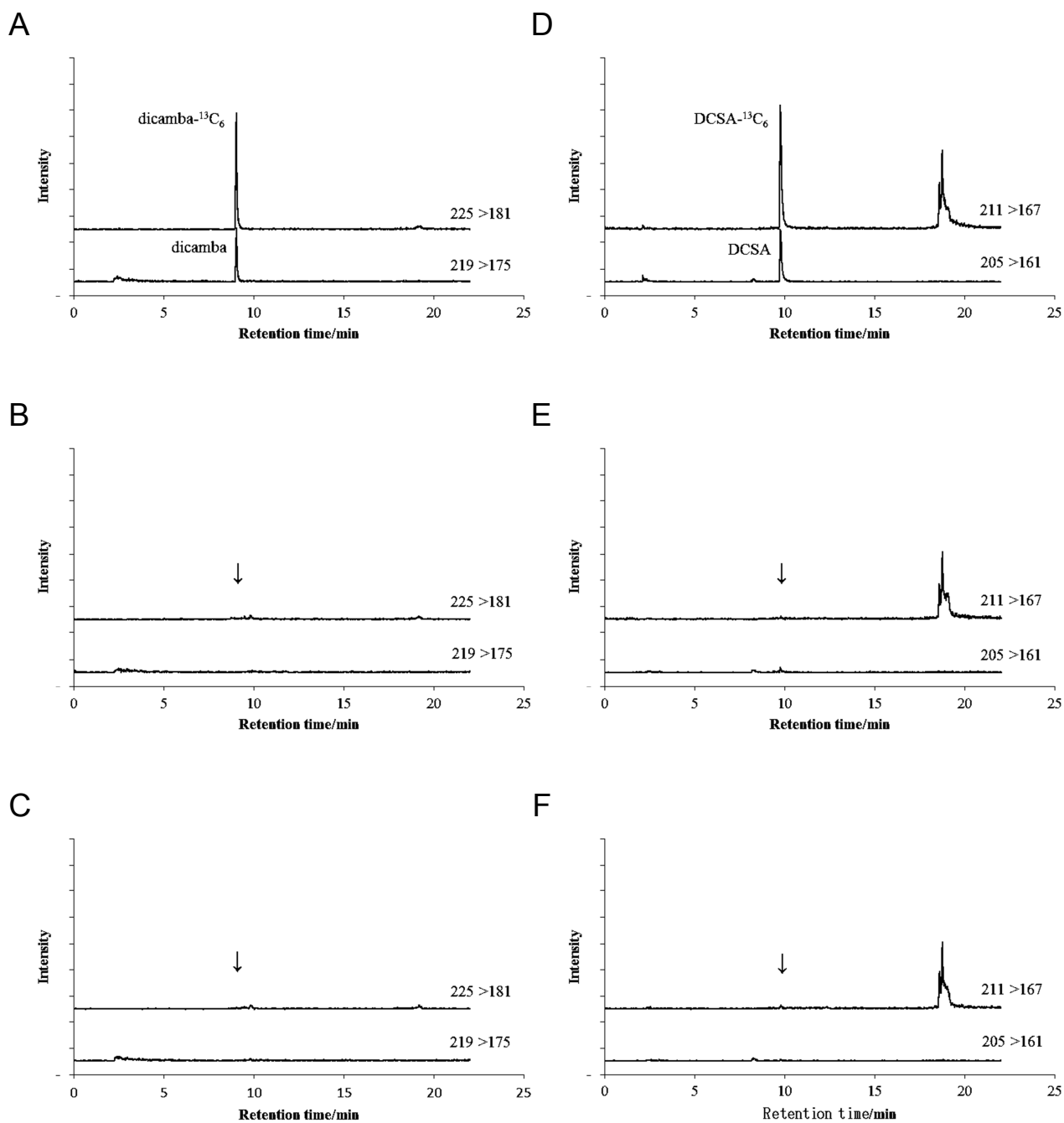


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms of standard solution and blank samples (Arrows indicate the retention time of dicamba and dicamba- $^{13}\text{C}_6$ , or DCSA and DCSA- $^{13}\text{C}_6$ . Scales of y-axis are the same all chromatograms. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution  
 (10 ng/mL: 0.05 ng as dicamba)  
 (20 ng/mL: 0.10 ng as dicamba- $^{13}\text{C}_6$ )  
 B: Blank sample of soybean  
 (sample solution I)  
 C: Blank sample of soybean meal  
 (sample solution I)

D: Standard solution  
 (1 ng/mL: 0.005 ng as DCSA)  
 (2 ng/mL: 0.010 ng as DCSA- $^{13}\text{C}_6$ )  
 E: Blank sample of soybean  
 (sample solution II)  
 F: Blank sample of soybean meal  
 (sample solution II)

## 3.5 添加回収試験

大豆及び大豆油かすにジカンバ及び DCSA として各 1 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でジカンバとして 10 及び 100, DCSA として 1 及び 10 ng/mL 相当量）を添加した各試料を本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。その結果は Table 8 のとおり、ジカンバの平均回収率は 88.3~100 %, その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 5.2 %以下で、DCSA の平均回収率は 86.2~101 %, その繰返し精度は  $RSD_r$  として 7.6 %以下であった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 8 Recoveries for dicamba and DCSA

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types			
		Soybean		Soybean (heat-flaked)	
		Recovery <sup>a),b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>a),b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)
Dicamba	1	100 ( 95.8 )	3.9	98.4 ( 77.2 )	2.1
	10	97.1 ( 84.7 )	0.9	94.7 ( 60.9 )	1.4
DCSA	1	101 (112 )	7.6	86.5 (111 )	4.2
	10	88.0 (103 )	1.5	91.9 (106 )	1.3

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types			
		Soybean meal		Soybean meal (extruded)	
		Recovery <sup>a),b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>a),b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)
Dicamba	1	95.0 (102 )	0.9	88.3 ( 91.7 )	2.5
	10	95.7 ( 71.2 )	5.2	98.8 ( 73.3 )	0.4
DCSA	1	98.7 (111 )	6.7	86.2 (100 )	4.0
	10	93.4 ( 86.9 )	3.1	91.1 (104 )	2.1

a) Mean ( $n=3$ )

b) Cells in parentheses stand for the recoveries of surrogates.

c) Relative standard deviation of repeatability

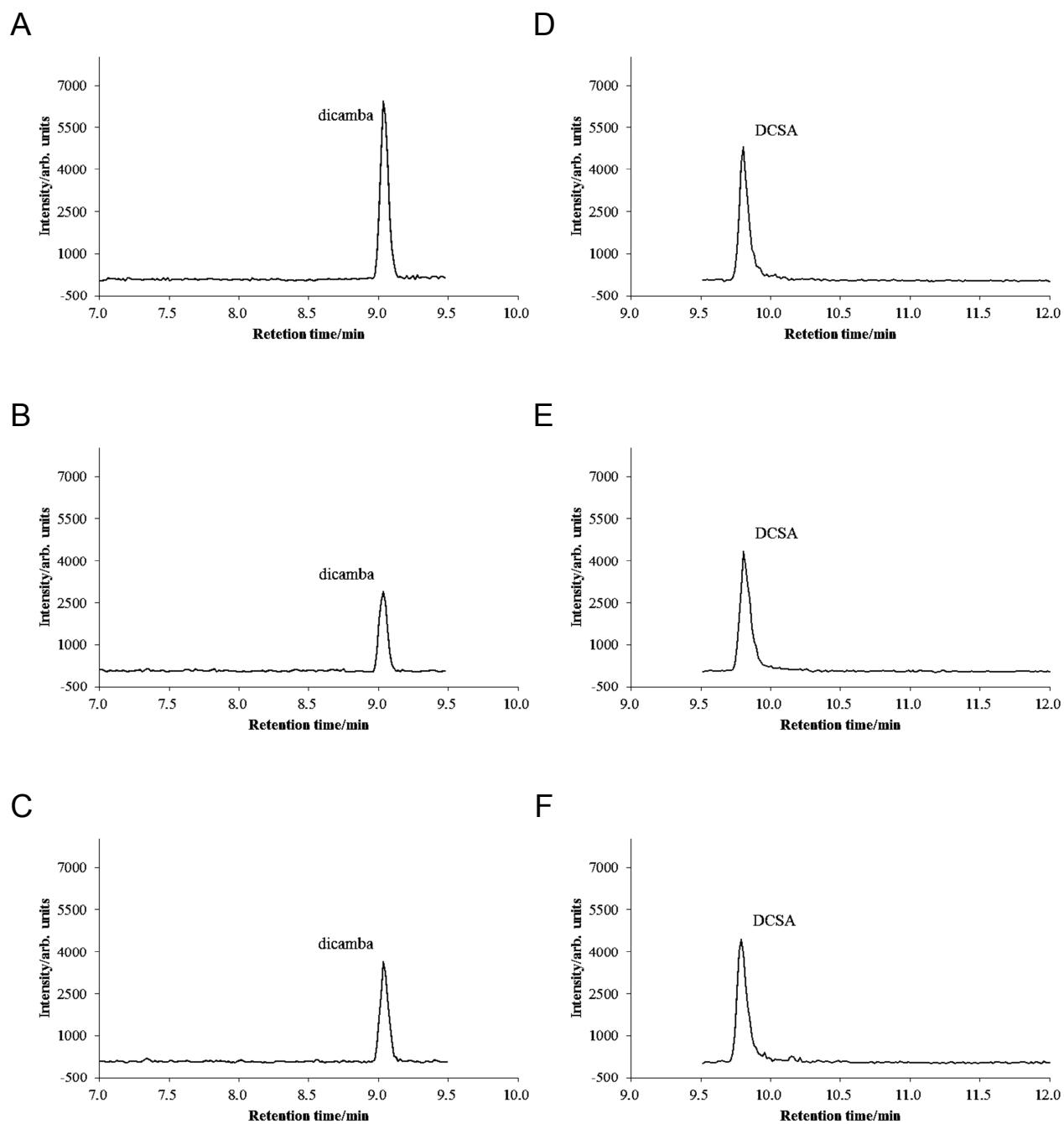


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms of standard solution and spiked samples

A: Standard solution

(10 ng/mL: 0.05 ng as dicamba)

B: Soybean spiked at 1 mg/kg of dicamba

(10 ng/mL as dicamba)

(sample solution I)

C: Soybean meal spiked at 1 mg/kg of dicamba

(10 ng/mL as dicamba)

(sample solution I)

D: Standard solution

(1 ng/mL: 0.005 ng as DCSA)

E: Soybean spiked at 1 mg/kg of DCSA

(1 ng/mL as DCSA)

(sample solution II)

F: Soybean meal spiked at 1 mg/kg of DCSA

(1 ng/mL as DCSA)

(sample solution II)

### 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、3.5 の添加回収試験で調製した 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でジカンバとして 10 及び DCSA として 1 ng/mL 相当量）の最終試料溶液 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからジカンバ及び DCSA のピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。その結果、SN 比が 10 以上となるジカンバ及び DCSA 濃度は 1 mg/kg, SN 比が 3 以上となる濃度は 0.3 mg/kg であったことから、本法におけるジカンバ及び DCSA の定量下限は 1 mg/kg, 検出下限は 0.3 mg/kg であった。

なお、Table 8 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった。

### 3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、大豆にジカンバとして 1 mg/kg 及び DCSA として 5 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して 1 mL 中にジカンバとして 10  $\mu$ g 及び DCSA として 50  $\mu$ g を含有する標準液 1 mL 添加）、大豆（加熱圧ぺん）にジカンバとして 5 mg/kg 及び DCSA として 10 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して 1 mL 中にジカンバとして 50  $\mu$ g 及び DCSA として 100  $\mu$ g を含有する標準液 1 mL 添加）及び大豆油かすにジカンバとして 10 mg/kg 及び DCSA として 1 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して 1 mL 中にジカンバとして 100  $\mu$ g 及び DCSA として 10  $\mu$ g を含有する標準液 1 mL 添加）を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた。参加試験室は、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般財団法人日本穀物検定協会中央研究所、フィード・ワン株式会社研究所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所品質管理研究室、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター及び同神戸センター（計 9 試験室）であった。結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>7), 8)</sup>を参考に、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、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度 ( $RSD_r$ ) 及び室間再現精度 ( $RSD_R$ ) を算出し、得られた  $RSD_R$  から、修正 Horwitz 式<sup>9)</sup>を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 9 及び Table 10 のとおりであった。大豆、大豆（加熱圧ぺん）及び大豆油かすについて、ジカンバの平均回収率はそれぞれ 100, 103 及び 98.2 %,  $RSD_r$  はそれぞれ 8.2, 3.1 及び 4.5 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 13, 6.8 及び 5.1 %, HorRat はそれぞれ 0.80, 0.54 及び 0.45 であった。DCSA の平均回収率はそれぞれ 101, 100 及び 103 %,  $RSD_r$  はそれぞれ 5.6, 4.7 及び 7.9 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 8.6, 7.4 及び 11 %, HorRat はそれぞれ 0.68, 0.65 及び 0.66 であった。1 つの試料について、ジカンバの HorRat がわずかに 0.5 を下回っていたが、これは、本法が安定同位体元素標識物質を用いた内標準法であるためと考えられた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 11 に示した。

Table 9 Collaborative study for dicamba

Lab. No.	Feed types					
	Soybean (mg/kg)		Soybean (heat-flaked) (mg/kg)		Soybean meal (mg/kg)	
1	0.918	0.890	5.31	5.71	9.51	8.93
2	0.991	1.01	4.99	4.98	9.74	10.2
3	0.914	1.14	4.87	5.05	9.31	10.5
4	0.812	0.954	5.10	4.89	9.79	9.78
5	1.32	1.17	5.52	5.97	9.94	10.6
6	0.968	1.01	5.25	5.19	10.0	10.2
7	1.02	1.07	5.11	5.00	9.56	9.54
8	0.881	0.981	4.62	4.70	10.2	10.4
9	1.62 <sup>a)</sup>	1.82 <sup>a)</sup>	5.40	5.35	8.79	9.77
Spiked level (mg/kg)	1		5		10	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	1.00		5.17		9.82	
Mean recovery <sup>b)</sup> (%)	100		103		98.2	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	8.2		3.1		4.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	13		6.8		5.1	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	16		12		11	
HorRat	0.80		0.54		0.45	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Soybean:  $n=16$ ; Soybean (steam-flaked):  $n=18$ ; Soybean meal:  $n=18$

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 10 Collaborative study for DCSA

Lab. No.	Feed types					
	Soybean (mg/kg)		Soybean (heat-flaked) (mg/kg)		Soybean meal (mg/kg)	
1	5.00	5.06	10.7	10.4	1.09	1.01
2	4.16	4.75	9.93	9.44	0.976	0.965
3	5.04	4.84	10.6	9.61	1.07	1.13
4	4.92	4.69	8.90	9.86	0.794	1.02
5	5.92	5.67	11.8	11.0	1.30	1.14
6	5.20	4.64	9.74	10.5	1.07	1.01
7	5.35	5.39	10.0	9.79	1.02	1.02
8	5.50	4.77	9.85	9.89	1.02	0.908
9	4.65	4.96	9.52	8.82	1.04	0.914
Spiked level (mg/kg)	5		10		1	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	5.03		10.0		1.03	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	101		100		103	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	5.6		4.7		7.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	8.6		7.4		11	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	13		11		16	
HorRat	0.68		0.65		0.66	

a)  $n=18$

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 11 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
2	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
3	LC: 1200 Series, Agilent Technologies MS/MS: API-3200 Q TRAP, AB SCIEX	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quatro Premier XE, Waters	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	LC: Prominence, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQD, Waters	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
8	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
9	LC: 1200 Series, Agilent Technologies MS/MS: 6410, Agilent Technologies	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)

#### 4 まとめ

大豆及び大豆油かす中のジカンバ及び DCSA について、JFRL 法を基に、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、内標準物質を用い、吸引ろ過を遠心分離に変更し、2 回目の液液分配を省略、混合標準液の希釈溶媒を変更及び LC-MS/MS への注入量を 10 µL から 5 µL に変更することで、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、ジカンバで 10~200 ng/mL (注入量として 0.05~1 ng) , DCSA で 1~20 ng/mL (注入量として 0.005~0.1 ng) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、ジカンバとして 10 及び 100 ng/mL 相当量、DCSA として 1 及び 10 ng/mL 相当量とした。

2) 大豆及び大豆油かすについて、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。

3) 大豆及び大豆油かすにジカンバ及び DCSA として各 1 及び 10 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 3 点併行で定量して回収率及び繰返し精度を求めたところ、良好な結果が得られた。

4) 本法におけるジカンバ及び DCSA の定量下限は試料中で 1 mg/kg, 検出下限は 0.3 mg/kg であった。

5) 大豆にジカンバとして 1 mg/kg 相当量及び DCSA として 5 mg/kg 相当量、大豆 (加熱圧ペン) にジカンバとして 5 mg/kg 相当量及び DCSA として 10 mg/kg 相当量及び大豆油かすにジカンバとして 10 mg/kg 相当量及び DCSA として 1 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、良好な結果が得られた。

## 謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，一般財団法人日本穀物検定協会中央研究所，フィード・ワン株式会社研究所，全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所品質管理研究室における関係者各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会：ジカンバ農薬評価書，平成 24 年 10 月 (2012).
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令の施行について，平成 27 年 7 月 27 日，19 消安第 2140 号 (2015).
- 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) 一般財団法人日本食品分析センター，一般財団法人食品環境検査協会：平成 25 年度飼料中の飼料中の有害物質等分析法開発事業 (2014).
- 6) Monsanto Company Standard Operating Procedure: Determination of dicamba and its major metabolites in soybean matrices by LC/MS/MS, AG-ME-1321-01 July 22 (2009), 非公開.
- 7) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, Pure & appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 8) AOAC Int. (2012). Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. In official methods of analysis of AOAC Int. 19 ed., Gaithersburg, MD, USA.
- 9) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, Analyst, 125, 385-386 (2000).

## 6 飼料用イネ中のフサライドのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

山本 克己<sup>\*1</sup>, 長久保 眞平<sup>\*2</sup>, 関口 好浩<sup>\*3</sup>

### Determination of Phthalide in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by GC-MS

Katsumi YAMAMOTO<sup>\*1</sup>, Shinpei NAGAKUBO<sup>\*2</sup> and Yoshihiro SEKIGUCHI<sup>\*3</sup>

(<sup>\*1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center

<sup>\*2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center

(Now Fertilizer and Feed Inspection Department)

<sup>\*3</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

An analytical method was developed to determine the level of phthalide in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

After adding water to the sample, phthalide was extracted with acetone and resulting solution was filtered. The sample solution was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The extract was purified with InertSep K-solute (GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) and Presep-C Florisil cartridge (Wako Pure Chemical Industries Ltd.; Osaka, Japan). The resulting solution was injected into the GC-MS for determination of the phthalide level. The GC separation was carried out on a fused silica capillary column (DB-5MS; 0.25 mm i.d.× 30 m, film thickness 0.25 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA). The mass spectrometer was operated in electron ionization (EI) mode.

Recovery tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice. Rice straw spiked with 6.5, 13 and 130 mg/kg, whole-crop rice silage spiked with 1.5, 3 and 30 mg/kg and paddy rice spiked with 0.5 and 10 mg/kg of phthalide respectively. The resulting mean recoveries ranged from 88.1 % to 102 %, and the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>) were not more than 4.0 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked with 130 mg/kg, 30 mg/kg and 1 mg/kg of phthalide respectively. The mean recovery, repeatability and reproducibility in the terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat, respectively, were 100 %, 2.1 %, 6.3 % and 0.83 for rice straw, 93.7 %, 1.8 %, 3.8 % and 0.40 for whole-crop rice silage, and 94.9 %, 5.0 %, 7.4 % and 0.46 for paddy rice.

This method was validated and established for use in the inspection of phthalide in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed.

Key words: phthalide; gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS); electron ionization (EI); rice straw; whole-crop rice silage; paddy rice; collaborative study

キーワード：フサライド；ガスクロマトグラフ質量分析計；電子イオン化法；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

<sup>\*1</sup> 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

<sup>\*2</sup> 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，現 肥飼料安全検査部

<sup>\*3</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

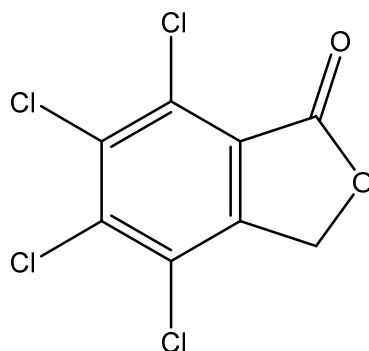
## 1 緒 言

フサライドは呉羽化学工業株式会社（現 株式会社クレハ）が開発したイネいもち病専用の防除剤で、優れた殺菌効果を持ち、国内外で広く用いられている<sup>1)</sup>。

我が国では、飼料の有害物質の指導基準<sup>2)</sup>において、稲わら中で 130 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCS」という。）中で 30 mg/kg の管理基準値が定められている。定量法としては、厚生労働省通知<sup>3)</sup>によりガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）を用いた一斉試験法が示されているが、飼料に適用できる分析法は飼料分析基準<sup>4)</sup>にはなく、開発が急務であった。

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」において開発したフサライド試験法<sup>5)</sup>（以下「JFRL 法」という。）を基にした定量法について飼料分析基準への適用の可否を検討し、JFRL 法の電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフ（以下「GC-ECD」という。）による測定から GC-MS による測定に変更することにより良好な結果を得たので、その概要を報告する。

参考にフサライドの構造式等を Fig. 1 に示した。



4,5,6,7-tetrachlorophthalide

$C_8H_2Cl_4O_2$  MW: 271.9 CAS No.: 27355-22-2

Fig. 1 Chemical structure of phthalide

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

稲わら及び籾米はそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。WCS は 60 °C で 5 時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉砕した。

### 2.2 試 薬

1) アセトン、ジエチルエーテル、シクロヘキサン及びヘキサンは残留農薬分析用を用いた。水は超純水（JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水）を、ポリエチレングリコール（以下「PEG」という。）は平均分子量 300 のものを、塩化ナトリウムは特級を用いた。

2) 希釈溶媒

PEG 1 mL にアセトンを加えて 100 mL とし、更にこの液 1 mL にヘキサンを加えて 200 mL の希釈溶媒を調製した。

3) フサライド標準液

フサライド標準品（純度 99.8%，関東化学製）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フサライド標準原液を調製した（この液 1 mL は、フサライドとして 0.5 mg を含有する。）。

使用に際して、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 中にフサライドとして 20  $\mu$ g を含有する液を調製した。この液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にフサライドとして 0.002, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15 及び 0.2  $\mu$ g を含有する各標準液を調製した。

### 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン、使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 乾牧草用粉碎機：SM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン、回転数（仕様）1430 rpm）
- 3) 振とう機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）
- 4) 多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute（10 mL 及び 20 mL 保持用） ジーエルサイエンス製
- 5) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Presep-C Florisil Cartridge（充てん剤量 800 mg） 和光純薬工業製にリザーバーを連結したもの
- 6) GC-MS：  
GC 部：7890A Agilent Technologies 製  
MS 部：5975C Agilent Technologies 製
- 7) GC-ECD：  
GC 部：GC-2010 Plus 島津製作所製  
ECD 部：ECD-2010 Plus 島津製作所製
- 8) メンブランフィルター：DISMIC-25HP（孔径 0.45  $\mu$ m, 直径 25 mm, PTFE） 東洋濾紙製
- 9) ゲル浸透クロマトグラフ（以下「GPC」という。）：GPC システム ジーエルサイエンス製

### 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 4 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40  $^{\circ}$ C 以下の水浴で約 1 mL 以下まで減圧濃縮した後、水 5 mL を加えてカラム処理 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（10 mL 保持用）に入れ、10 分間静置した。200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 10 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下してフサライドを溶出させた。更にヘキサン 70 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40  $^{\circ}$ C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。ヘキサン 2 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

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムをヘキサン 10 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 2 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。更にヘキサソージエチルエーテル (24+1) 20 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、ヘキサソアセトン (19+1) 10 mL を加えてフサライドを溶出させた。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。希釈溶媒 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、更にこの液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈（稲わら 50 倍、WCS 25 倍、粃米 4 倍）し、GC-MS による測定に供する試料溶液とした。

## 4) GC-MS による測定

試料溶液及び各標準液 2  $\mu$ L を GC-MS に注入し、選択イオン検出（以下「SIM」という。）クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 に示した。

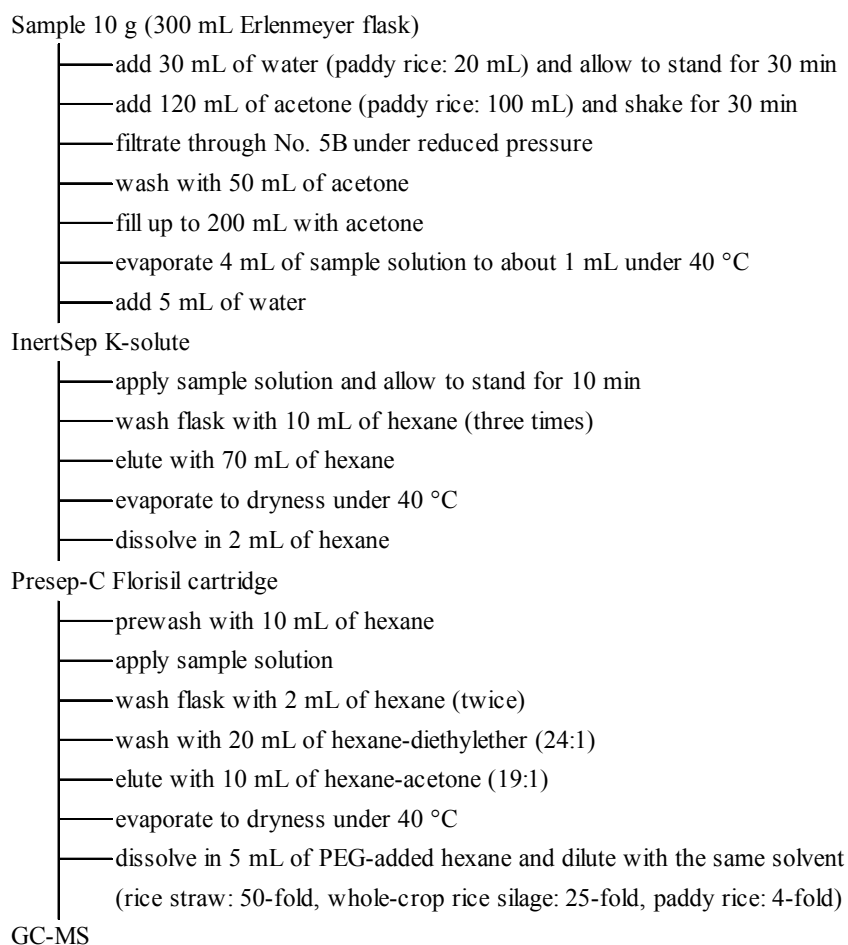
Table 1 Operating conditions of GC-MS

Column	DB-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 $\mu$ m film thickness), Agilent Technologies
Column temperature	70 °C (hold for 2 min) $\rightarrow$ ramp 20 °C/min $\rightarrow$ 280 °C (hold for 10 min)
Injection mode	Splitless (120 s)
Injection port temperature	250 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Interface temperature	280 °C
Ion source temperature	250 °C
Ionization	Electron ionization
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	$m/z$ 243 (for quantification), 272 (for confirmation)

## 5) 計 算

得られた SIM クロマトグラムからフサライドのピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のフサライド量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for phthalide in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed by GC-MS

## 2.5 GC-ECD による測定

2.2 の 3) に従い調製した 20 µg/mL 標準液の一定量をヘキサンで正確に希釈し、1 mL 中にフサライドとして 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 及び 0.25 µg を含有する各標準液を調製した。各標準液 1 µL を GC-ECD に注入し、クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 に示した。

Table 2 Operating conditions of GC-ECD

Column	DB-1701 (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 µm film thickness), Agilent Technologies
Column temperature	70 °C (hold for 2 min) → ramp 20 °C/min → 280 °C (hold for 10 min)
Injection mode	Splitless (120 s)
Injection port temperature	250 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Make-up gas	N <sub>2</sub> 60 mL/min
Detector temperature	300 °C

## 2.6 カラム処理 I に係る検討方法

稲わらを用い、2.4 の 1) に従い調製した試料溶液にフサライドとして 65 mg/kg 相当量 (最終試

料溶液中で 0.052  $\mu\text{g}/\text{mL}$  相当濃度) を添加し, 水 5 mL 又は飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL (直後の操作で多孔性ケイソウ土カラム (20 mL 保持用) を用いた場合は 20 mL) を加えた. この液を多孔性ケイソウ土カラム (10 mL 保持用又は 20 mL 保持用) に入れ, 10 分間静置し, 以下 2.4 の 2)以降に従いフサライドを定量した.

### 2.7 GPC による精製操作を追加した定量方法

粃米を用い, 2.4 の 1)及び 2)に従い操作して得られたカラム処理 I の溶出液を 40  $^{\circ}\text{C}$  以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 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, メンブランフィルターでろ過した. この液 5.0 mL を GPC に注入し, フサライドが溶出する画分を 200 mL のなす形フラスコに分取し, 40  $^{\circ}\text{C}$  以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. なお, GPC の条件を Table 3 に示した.

ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かし, 2.4 の 3)に従い操作した.

Table 3 Operating condition of GPC

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d.×300 mm, 15 $\mu\text{m}$ ), Showa Denko
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d.×100 mm, 15 $\mu\text{m}$ ), Showa Denko
Eluent	Cyclohexane - acetone (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	110~135 mL

### 2.8 GPC による精製操作の省略の可否に係る検討方法

フサライドとして粃米に 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GPC による精製を省略した場合は 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  相当量, 省略しない場合は 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  相当量) を添加し, 2.4 及び 2.7 に従い操作して得られた試料溶液を GC-MS に注入し, 回収率を比較した.

## 3 結果及び考察

### 3.1 GC-ECD による検討

2.5 に従い調製したフサライド標準液各 1  $\mu\text{L}$  を GC-ECD に注入し, 得られたクロマトグラムからフサライドのピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した. その結果, Fig. 2 のとおり, フサライドは 0.005~0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (注入量として 0.005~0.25 ng 相当量) の範囲で決定係数 0.99 以上の直線の検量線が得られたものの, 低濃度ではその直線から下に外れる結果となった. この検量線を用いた場合, 低濃度ではフサライドの定量値が低く見積もられることから, 筆者らが用いた GC-ECD による定量は困難であると判断した.



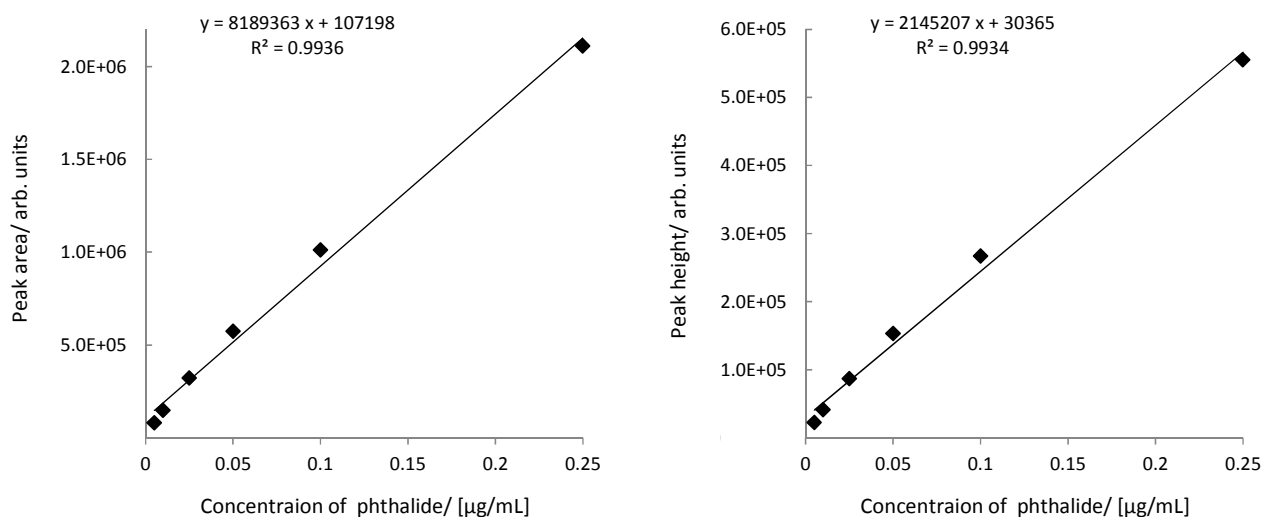


Fig. 2 Calibration curves of phthalide by peak area (left) and peak height (right) for GC-ECD

### 3.2 GC-MS による検討

#### 1) モニターイオンの検討

2.2 の 3)に従い調製したフサライド標準液を用いて、本法の測定条件によりスキャンモードで測定したところ、Fig. 3 に示すマススペクトルが得られた。この結果から、モニターイオンとして  $m/z$  243 を定量イオンに、 $m/z$  272 を確認イオンに設定した。

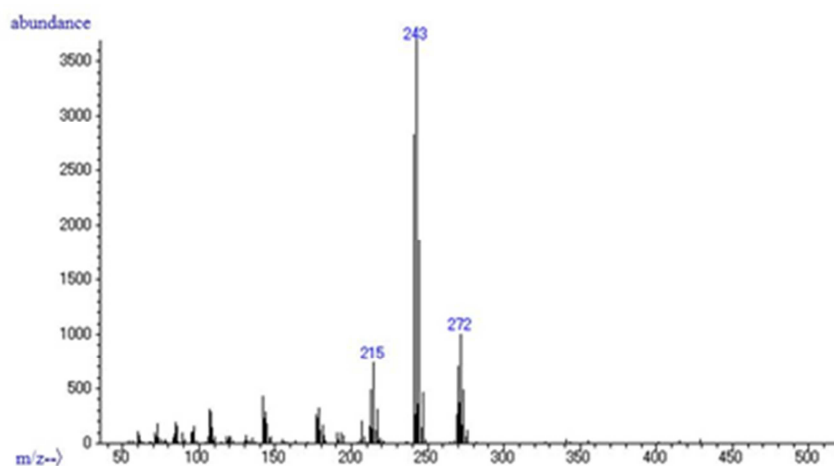


Fig. 3 Mass spectrum of phthalide standard solution

#### 2) 希釈溶媒の検討

JFRL 法では、希釈溶媒にヘキサンを用いることから、同溶媒を用いて標準液を調製し GC-MS に注入したところ、低濃度になるに従いフサライドのピークのテーリングが大きくなり、良好な検量線を作成することができなかった。

このことを解消するため、ヘキサンに PEG を 0.005 v/v%相当量添加した希釈溶媒を用いて標準液を調製し GC-MS に注入したところ、テーリングが改善され、ピーク形状が良好となった。このことから、本法では希釈溶媒として 0.005 v/v%相当量の PEG を添加したヘキサンを使用することとした。

参考として、希釈溶媒の違いによるフサライド標準液の SIM クロマトグラムを Fig. 4 に示した。

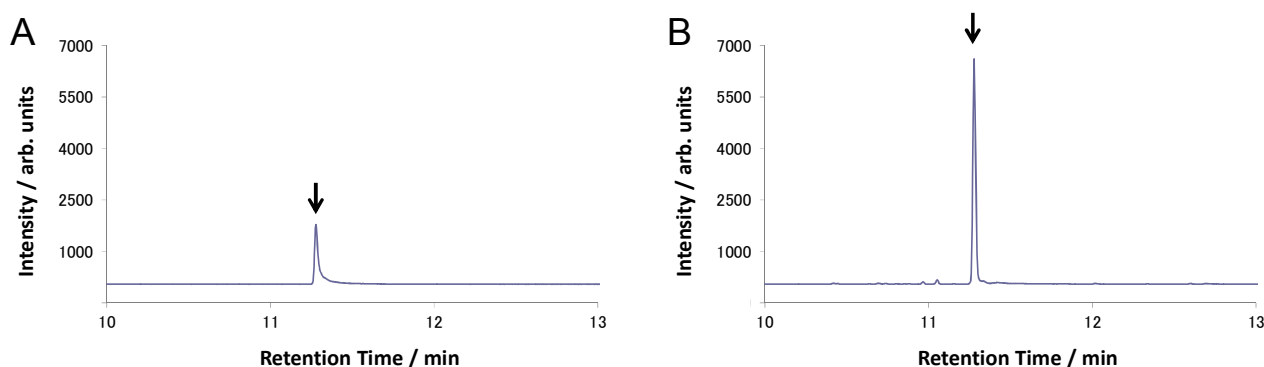


Fig. 4 Selected ion monitoring chromatograms of phthalide standard solution (0.05 µg/mL)  
(Arrows indicate the retention time of phthalide.)

A: Standard solution prepared with hexane

B: Standard solution prepared with 0.005 % PEG-added hexane

### 3.3 検量線

2.2 の 3) に従い調製した各フサライド標準液各 2 µL を GC-MS に注入し、得られた SIM クロマトグラムからピーク面積及びピーク高さを用いて検量線を作成した。その結果、Fig. 5 のとおり、ピーク面積の場合、フサライドは 0.002~0.2 µg/mL (注入量として 0.004~0.4 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。ピーク高さはピーク面積よりも決定係数が悪かったため、ピーク面積で定量することとした。

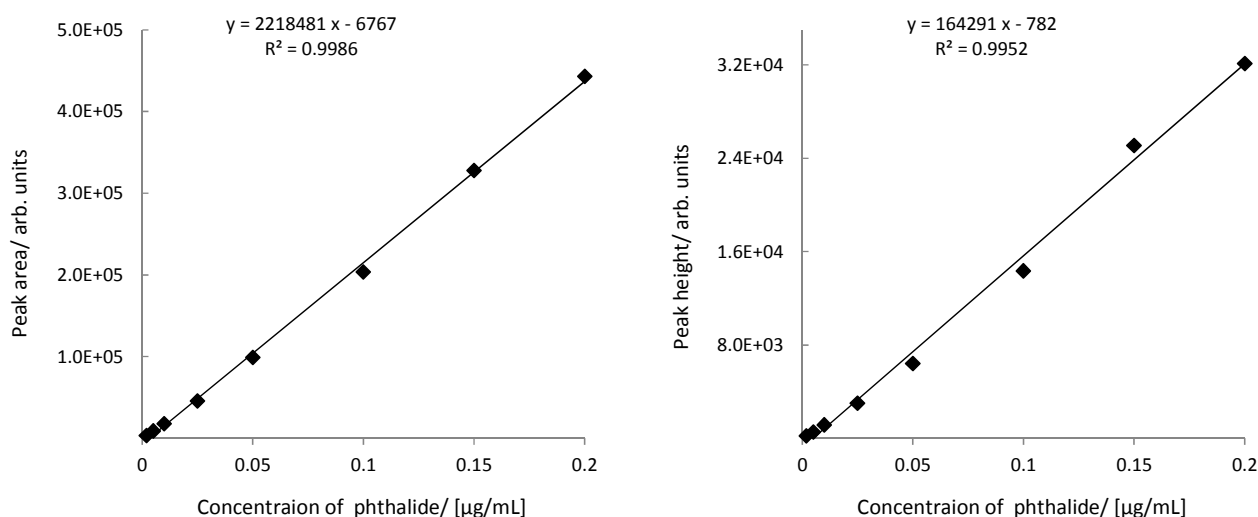


Fig. 5 Calibration curves of phthalide by peak area (left) and peak height (right) for GC-MS

### 3.4 カラム処理 I に係る検討

JFRL 法では保持容量が 20 mL の InertSep K-solute を用いているが、供試液量が約 6 mL であることを考慮すると容量が大きいと考えられた。また、JFRL 法における稲わらでの検討結果が回

収率 85 %と低い傾向が認められたことから、多孔性ケイソウ土カラムにフサライドが残留している可能性が考えられた。このことから、2.6 に基づき、保持容量が少ない 10 mL の多孔性ケイソウ土カラム使用の可否、更に飽和塩化ナトリウム溶液の使用の有無が回収率に与える影響を確認した。

結果は Table 4 のとおり、保持容量 10 mL で飽和塩化ナトリウム溶液を用いない条件が最も良い回収率であった。

以上の結果から、多孔性ケイソウ土カラムは保持容量 10 mL のものを用い、かつ飽和塩化ナトリウム溶液を用いないこととした。

Table 4 Recoveries of phthalide compared by aqueous capacity of InertSep K-solute and use of saturated NaCl solution

Aqueous capacity of InertSep K-solute (mL)	Saturated NaCl solution	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
20	Not used	92.9	9.8
20	Used	85.3	2.5
10	Not used	96.5	4.3
10	Used	95.4	2.1

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.5 GPC による精製操作の省略の検討

JFRL 法では、稲わらを除く飼料において、カラム処理 I を行った試料溶液を GPC により精製しているが、稲わらでは抽出液の採取量を減らし、かつヘキササンによる希釈倍率を高めることにより GPC による精製操作を省略している。そこで、飼料用イネのうち希釈倍率が最も低い粳米を用いて、同様に GPC による精製操作の省略の可能性を 2.8 に基づき検討した。

結果は Table 5 のとおり、両者間で明確な差が認められなかったことから、飼料用イネにおいては GPC による精製操作が省略可能であると考えられた。

Table 5 Effects of omission of clean-up by GPC

Spiked level (mg/kg)	Run No.	Preparation with clean-up by GPC	Preparation without clean-up by GPC
		Recovery (%)	Recovery (%)
10	1	108	103
	2	110	105
	3	101	105
Mean recovery (%)		106	104
RSD <sub>r</sub> <sup>a)</sup> (%)		4.5	1.5

a) Relative standard deviation of repeatability

### 3.6 妨害物質の検討

稲わら 4 検体、WCS 4 検体及び粳米 2 検体を用い、本法により調製した試料溶液を GC-MS に

注入し、得られた SIM クロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においても定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 6 に示した。

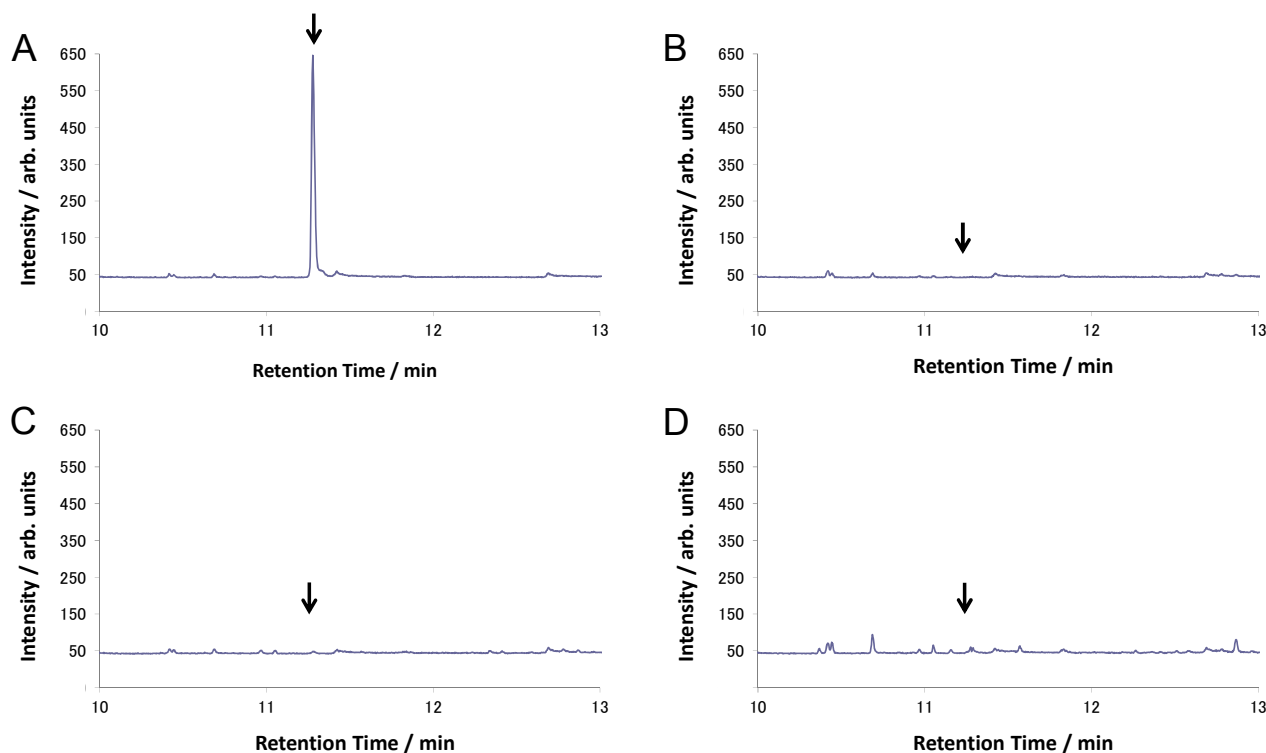


Fig. 6 Selected ion monitoring chromatograms of standard solution and sample solution (blank)  
(Arrows indicate the retention time of phthalide.)

A: Standard solution (0.005  $\mu\text{g/mL}$ : 0.01 ng as phthalide)

B: Rice straw

C: Whole-crop rice silage

D: Paddy rice

### 3.7 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 3)により調製した稲わら、WCS 及び粳米のブランク試料溶液にフサライドとして 12.5, 2.75 及び 1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.01  $\mu\text{g/mL}$  相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について、2.2 の 3)に従って調製した同濃度のフサライド標準液に対するピーク面積比を確認したところ、ピーク面積比はそれぞれ 104 %, 97 %及び 108 %であり、フサライドは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

### 3.8 添加回収試験

2.1 により調製した飼料用イネについて、フサライドとして、稲わらに 6.5, 13 及び 130 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.0052, 0.0104 及び 0.104  $\mu\text{g/mL}$  相当量) を添加した試料、WCS に原物中に換算して 1.5, 3 及び 30 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.0055, 0.0109 及び 0.109  $\mu\text{g/mL}$  相当濃度) 及び粳米に 0.5 及び 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.005 及び 0.1  $\mu\text{g/mL}$  相当濃度) をそれぞれ添加し、本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

また、WCS については原物の水分含有量を 60 %と想定し、原物中濃度への換算は、原物（水分含有量 60 %）中濃度＝風乾物（水分含有量 10 %）中濃度／2.25 の式から求めた。

その結果は Table 6 のとおり、稲わら、WCS 及び粳米におけるフサライドの平均回収率は 88.1~102 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD<sub>r</sub>）として 4.0 %以下の成績が得られた。

なお，得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 7 に示した。

Table 6 Recoveries for phthalide

Spiked level (mg/kg)	Feed types					
	Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
0.5	—	—	—	—	92.8	2.1
1.5	—	—	90.5	4.0	—	—
3.0	—	—	92.0	2.9	—	—
6.5	92.1	3.4	—	—	—	—
10	—	—	—	—	102	1.4
13	89.0	3.4	—	—	—	—
30	—	—	93.9	0.4	—	—
130	88.1	0.9	—	—	—	—

—: Not tested

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

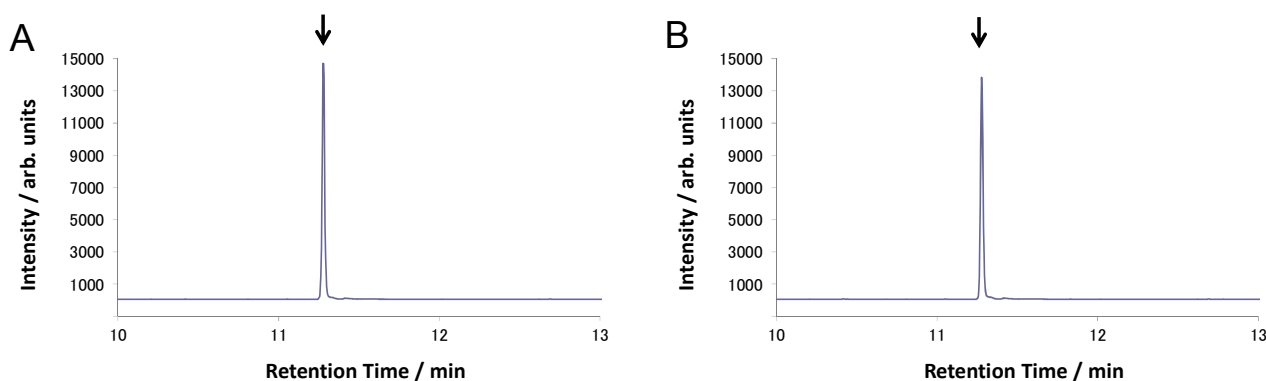


Fig. 7 Selected ion monitoring chromatograms

(Arrows indicate the retention time of phthalide.)

A: Standard solution (0.1  $\mu\text{g/mL}$ : 0.2 ng as phthalide)

B: Sample solution of rice straw spiked at 130 mg/kg of phthalide (0.104  $\mu\text{g/mL}$  as phthalide)

### 3.9 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，WCS 及び粳米にフサライドを添加した添加回収試験により得られたピークの 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 以上となる濃度は稲わら，WCS（風乾物）及び粳米

中でそれぞれ 7, 3 及び 0.5 mg/kg, SN 比が 3 となる濃度はそれぞれ 2, 1 及び 0.2 mg/kg であったことから, 本法の稲わら, WCS (風乾物) 及び粳米中での定量下限はそれぞれ 7, 3 及び 0.5 mg/kg, 検出下限はそれぞれ 2, 1 及び 0.2 mg/kg であった.

なお, Table 6 に示したとおり, 当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった.

### 3.10 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため, 濃度非通知, かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した.

共通試料としては, フサライドとして稲わらに 130 mg/kg (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 1300 µg を含有する標準液 1 mL 添加) を, WCS に原物換算して 30 mg/kg (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 675 µg を含有する標準液 1 mL 添加) を, 粳米に 1 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 10 µg を含有する標準液 1 mL 添加) を, それぞれ各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた. 参加試験室は, 一般財団法人マイコトキシン検査協会, JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部分析・開発センター, アジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンター, 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) であった. 結果の解析については, 国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>6), 7)</sup>を参考に, 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, 外れ値の有無を確認した上で平均回収率, 繰返し精度 ( $RSD_r$ ) 及び室間再現精度 ( $RSD_R$ ) を算出し, 得られた  $RSD_R$  から, 修正 Horwitz 式<sup>8)</sup>を用いて HorRat を求めた.

結果は Table 7 のとおりであった. 稲わら, WCS 及び粳米について, フサライドの平均回収率は 100, 93.7 及び 94.9 %,  $RSD_r$  は 2.1, 1.8 及び 5.0 %,  $RSD_R$  は 6.3, 3.8 及び 7.4 %, HorRat は 0.83, 0.40 及び 0.46 であり良好な結果であった. HorRat が 0.50 をわずかに下回っているものがあったが, 分析操作が比較的簡便であることによるものと思われた.

参考のため, 各試験室で使用した GC-MS の機種等を Table 8 に示した.

Table 7 Collaborative study for phthalide

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	113	112	30.3	28.9	0.954	0.950
2	135	140	28.2	27.9	0.907	1.02
3	132	134	27.4	26.8	0.929	0.920
4	134	132	29.4	28.5	1.08	0.942
5	142	135	28.0	28.4	0.892	0.873
6	120	127	27.9	27.9	0.880	0.914
7	129	130	26.5	27.4	0.926	0.987
8	134	132	29.4	29.2	0.872	0.904
9	135	133	26.6	27.2	1.05	1.09
Spiked level (mg/kg)	130		30		1	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	131		28.1		0.949	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	100		93.7		94.9	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	2.1		1.8		5.0	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	6.3		3.8		7.4	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	7.7		9.7		16	
HorRat	0.83		0.40		0.46	

a)  $n=18$ 

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 8 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	GC colume
		(i.d.×length, film thickness)
1	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
2	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
3	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
4	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-5MS, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
5	GCMS-QP2010 nc, Shimadzu	DB-5MS, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
6	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-5MS + DG, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm, Duraguard 10 m)
7	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-5MS + DG, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm, Duraguard 10 m)
8	GC: 7890GC, Agilent Technologies MS: 5977A extractorMSD, Agilent Technologies	DB-5MS, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
9	GC: 6890N, Agilent Technologies MS: 5973 inertMSD, Agilent Technologies	HP-5MS, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)

#### 4 まとめ

飼料用イネ中に残留するフサライドの定量法について、JFRL 法を基に飼料分析基準への適用の可否を検討したところ、検出器 (GC-ECD から GC-MS へ) の変更、希釈溶媒の変更、カラム処理 I での保持容量の変更及び GPC による精製を省略することにより、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、0.002~0.2 μg/mL (注入量として 0.004~0.4 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。  
なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、稲わらで 0.0052, 0.0104 及び 0.104 μg/mL 相当、WCS で 0.0055, 0.0109 及び 0.109 μg/mL 相当及び粳米で 0.005 及び 0.1 μg/mL 相当とした。
- 2) 飼料用イネについて、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) フサライドとして、稲わらに 6.5, 13 及び 130 mg/kg 相当量、WCS に原物中に換算して 1.5, 3 及び 30 mg/kg 相当量及び粳米に 0.5 及び 10 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ところ、良好な結果が得られた。
- 4) 本法のフサライドの定量下限は稲わら、WCS (風乾物) 及び粳米中でそれぞれ 7, 3 及び 0.5 mg/kg, 検出下限は稲わら、WCS (風乾物) 及び粳米中でそれぞれ 2, 1 及び 0.2 mg/kg であった。
- 5) フサライドとして、稲わらに 130 mg/kg, WCS に原物換算して 30 mg/kg 及び粳米に 1 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、良好な結果が得られた。



## 謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人マイコトキシソ検査協会、JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部分析・開発センター、アジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンターにおける関係者各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 青木勝道：農薬の作用点と作用機構 (3) フサライドの作用機構，日本農薬学会誌，6，355-364 (1981).
- 2) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準の制定について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について，平成 17 年 1 月 24 日，食安発 0124001 号 (2005).
- 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) 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開発委託事業 (2010).
- 6) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 7) AOAC Int. (2012). Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. In official methods of analysis of AOAC Int. 19 ed., Gaithersburg, MD, USA.
- 8) Michel Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

## 7 愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中のプロピレングリコールのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

小塚 健志<sup>\*1</sup>, 山本 謙吾<sup>\*2</sup>

### Determination of Propylene Glycol in Dry and Semi-dry Type Pet Food by GC-MS

Kenji KOZUKA<sup>\*1</sup> and Kengo YAMAMOTO<sup>\*2</sup>

(<sup>\*1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

<sup>\*2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department  
(Now Food Labeling Monitoring Department))

An analytical method was developed to determine the level of propylene glycol in dry type and semi-dry type pet food using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

After adding water to the samples and further defatting them with hexane, propylene glycol was extracted with methanol. The extract was purified with Supelclean ENVI-Carb-II/SAX/PSA (Sigma-Aldrich Co. LLC; St. Louis, MO, USA), and injected into the GC-MS for determination of the propylene glycol level. GC separation was carried out on a fused silica capillary column (DB-WAX; 0.25 mm i.d. × 30 m, film thickness 0.25 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA).

Recovery tests were conducted on pet foods. Five kinds of dry type pet food were spiked with 500 mg/kg or 5000 mg/kg of propylene glycol. The resulting mean recoveries ranged from 94.3 % to 105 % and repeatability in terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>) were not more than 4.3 %. Two kinds of semi-dry type pet food were spiked with 500 mg/kg or 5000 mg/kg of propylene glycol. The resulting mean recoveries ranged from 99.3 % to 106 % and RSD<sub>r</sub> were not more than 2.1 %.

A collaborative study was conducted in eleven laboratories, using dry type pet foods spiked with 1000 mg/kg and 5000 mg/kg of propylene glycol, respectively, and using semi-dry type pet food that contained propylene glycol. The resulting mean recoveries, repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat, respectively, were 102 %, 98.6 %, 1.5 %, 2.3 %, 4.7 %, 3.3 % and 0.83, 0.75 for dry type pet food. The resulting RSD<sub>r</sub>, RSD<sub>R</sub> and HorRat were 2.5 %, 4.5 % and 0.95 for semi-dry type pet food.

This method was validated and established for use in the inspection of propylene glycol in dry type and semi-dry type pet food.

Key words: propylene glycol; gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS); pet food; collaborative study

キーワード：プロピレングリコール；ガスクロマトグラフ質量分析計；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

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

<sup>\*2</sup> 独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 表示監視部

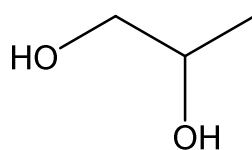
## 1 緒 言

プロピレングリコールは、吸湿性及び粘性がある無色の液体で、品質保持剤等として用いられる。食品、添加物等の規格基準<sup>1)</sup>では、使用基準量として生めん及びいかくん製品で 2.0 %以下、ギョウザ、シュウマイ、春巻及びワンタンの皮で 1.2 %以下、その他の食品で 0.60 %以下としている。

愛玩動物用飼料においては、プロピレングリコールは、セミドライ製品の保湿性を向上させるために数%の割合で添加されるが、猫の赤血球を減少させるおそれがあり 0.5 %を超える添加で健康影響の可能性がある<sup>2)</sup>と報告されている。このことから、省令<sup>3)</sup>ではプロピレングリコールは、猫を対象とする販売用愛玩動物用飼料に用いてはならないと規定し、一方、局長通知<sup>4)</sup>で原材料に由来するプロピレングリコールであって、その含有量が猫への健康影響が想定されない量である場合まで規制対象とはしないとされている。猫用愛玩動物用飼料に原材料としてプロピレングリコールの添加が疑われる場合にはその含有量を確認する必要性が生じるが、平成 26 年度検討当時には、愛玩動物用飼料等の検査法（以下「ペット検査法」という。）<sup>5)</sup>にはその分析法が収載されていない状況にあった。

そこで、一般財団法人日本食品分析センターが「平成 25 年度愛玩動物用飼料安全確保体制強化委託事業」において開発した方法（以下「JFRL 法」という。）<sup>6)</sup>を基に、ペット検査法への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考にプロピレングリコールの構造式等を Fig. 1 に示した。



propane-1,2-diol

$C_3H_8O_2$  MW: 76.09 CAS No.: 57-55-2

Fig. 1 Chemical structure of propylene glycol

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

愛玩動物用飼料（猫用ドライ製品、犬用ドライ製品及び犬用セミドライ製品）をそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。なお、検討に用いた愛玩動物用飼料を Table 1 に示した。

Table 1 Ingredients list of pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Dry type for cats 1	Corn, chicken, corn gluten meal, animal oil and fat, rice, beet pulp, fish oil, green pea, chicken extract, vegetable oil, wheat, hydrolyzed crustacean, hydrolyzed pig cartilage, carnitine, minerals (Ca, Na, K, Cl, Cu, Fe, Mn, Se, Zn, I), vitamins (V.A, V.B <sub>1</sub> , V.B <sub>2</sub> , V.B <sub>6</sub> , V.B <sub>12</sub> , V.C, V.D <sub>3</sub> , V.E, $\beta$ -carotene, niacin, pantothenic acid, folic acid, biotin, choline), amino acids (threonine, taurine, tryptophan, methionine, lysine), antioxidants (mixed tocopherol, rosemary extracts)
Dry type for cats 2	Grains (corn, corn gluten meal, wheat flour, rice bran, hominy feed), meats (meat meal, chicken meal, powdered white meat), fishes (fish meal, powdered fish, powdered white fish, etc.), oils and fats (animal fat, evening primrose oil), soybean meal, oligosaccharide, vegetables (powdered cabbage, powdered carrot, powdered spinach, powdered pumpkin), beer yeast, beet pulp, $\beta$ -glucan, milk calcium, glucosamine, rosemary, basil, minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I), vitamins (V.A, V.D, V.E, V.K, V.B <sub>1</sub> , V.B <sub>2</sub> , V.B <sub>6</sub> , pantothenic acid, niacin, folic acid, choline), amino acids (methionine, taurine), food yellow no.5, food yellow no.4, food blue no.1, food red no.3, food red no.102, antioxidants (rosemary extracts)
Dry type for cats 3	Grains (corn, wheat flour, etc.), vegetable protein, meats (chicken, chicken extracts, etc.), oils and fats (palm oil, soybean oil, etc.), soybean, fishes (fish extracts, bonito, dried bonito, etc.), vegetables (spinach, carrot, etc.), vitamins (V.A, V.B <sub>1</sub> , V.B <sub>2</sub> , V.B <sub>5</sub> , V.B <sub>6</sub> , V.B <sub>12</sub> , V.E, choline, niacin, folic acid), minerals (Zn, K, Ca, Cl, Se, Fe, Cu, Na, Mn, I, P), amino acids (taurine, methionine), preservative (potassium sorbate), coloring (food red no.102, food blue no.2, food yellow no.4, food yellow no.5), antioxidants (citric acid, BHA, BHT), pH adjuster
Dry type for dogs 1	Corn protein, animal fat (pig and cattle), corn, fish meal, wheat, potato protein, egg, minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se), sugar, rice, hydrolyzed protein (chicken and turkey), buttermilk powder, cellulose powder, methionine, psyllium husk, vitamins (V.A, V.B <sub>1</sub> , V.B <sub>2</sub> , V.B <sub>6</sub> , V.B <sub>12</sub> , niacin, pantothenic acid, biotin, V.C, V.D <sub>3</sub> , V.E, V.K, choline), taurine, sunflower oil, antioxidants (BHT, BHA, propyl gallate)
Dry type for dogs 2	Chicken, rice, whole wheat, beef tallow, sucrose, meat extracts (gravy), beer yeast, oats, milk powder, corn, soybean, canola oil, glucose, fish oil, fish, fructo-oligosaccharide, yucca extracts, antioxidants (mixed tocopherol, rosemary extracts), vitamins (V.C, V.E, V.B <sub>3</sub> , calcium pantothenate, V.A acetate, V.B <sub>1</sub> , V.B <sub>6</sub> , V.D, folic acid, V.K, V.B <sub>12</sub> , biotin), minerals (Ca, P, Fe, S, Zn, Cu, Se, Mn, K, I, Co)
Semi-dry type for dogs 1	Chicken, defatted soybean, corn starch, D-sorbitol, processed starch, glycerin, minerals (Ca, P, Zn, Na, Cu, I), sodium lactate, seasoning, powdered egg yolk, sugar, flavoring, salt, thickening (guar gum), pH adjuster, preservative (sorbic acid), perilla oil, antioxidant (extracted vitamin E), vitamins (V.A, V.E, V.D, calcium pantothenate, V.B <sub>12</sub> , V.B <sub>2</sub> ), powdered cartilage of shark, glucosamine, yeast
Semi-dry type for dogs 2	Beef, chicken, pork, soybean curd refuse, soft roe of salmon, mashed potato, starch syrup, wheat protein, wheat flour, corn starch, rice bran, defatted soybean, egg, vegetable oil, cheese, minerals (Na, Cl, Zn, Fe, Cu, I), yeast, sasa extract, lactobacillus, wetting (sorbitol, glycerin), pH adjuster (sodium lactate, sodium phosphate, DL-malic acid), calcium-enriching (calcium phosphate, calcium lactate), antioxidants (sodium erythorbate, vitamin E), oligosaccharide, preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite)

## 2.2 試薬

- 1) メタノール及びヘキサンは特級を用いた。
- 2) プロピレングリコール標準液

プロピレングリコール標準品（純度 99.9 %, 和光純薬工業製）100 mg を正確に量って 20 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プロピレングリコール標準原液を調製した（この液 1 mL は、プロピレングリコールとして 5 mg を

含有する。）。

使用に際して、プロピレングリコール標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にプロピレングリコールとして 5, 20, 40, 60, 80, 100 及び 120 µg を含有する各標準液を調製した。

### 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-200 Retsch 製（1 mm スクリーン、使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 280 rpm）
- 3) グラファイトカーボン／トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル／エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（以下「3 層ミニカラム」という。）：  
Supelclean Envi-Carb II /SAX/PSA（充てん剤量 500 mg／500 mg／500 mg） Sigma-Aldrich 製
- 4) トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル／エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（以下「2 層ミニカラム」という。）： Bond Elut SAX/PSA（充てん剤量 500 mg／500 mg） Agilent Technologies 製
- 5) ガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）：  
GC 部：GC-2010 島津製作所製  
MS 部：GCMS-QP2010 島津製作所製

### 2.4 定量方法

#### 1) 脱脂

分析試料 2.0 g を量って 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、水 2 mL（セミドライ製品は水 1 mL）を加え、よく振り混ぜて試料を潤した後、更にヘキサン 20 mL を加え、固形物と溶液を混ざり合うまで振り混ぜてから、10 分間振り混ぜて脱脂した。脱脂後の内容物を 2000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を捨てた。ヘキサン 20 mL を先の共栓遠心沈殿管に加えて同様に操作した後、窒素ガスを送って共栓遠心沈殿管内に残ったヘキサンを除去し、抽出に供する残留物とした。このとき、ヘキサンを効率良く除去するため、必要に応じて 40 °C の水浴中で共栓遠心沈殿管を加温した。

#### 2) 抽出

メタノール 20 mL を残留物に加え、共栓遠心沈殿管を時々振り混ぜながら水温 50 °C で 20 分間超音波処理した後、2000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を 50 mL の首太全量フラスコに入れた。先の残さにメタノール 20 mL を加え、固形物と溶液を混ざり合うまで振り混ぜてから、10 分間振り混ぜた後、2000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を先の 50 mL の首太全量フラスコに合わせた。更に首太全量フラスコの標線までメタノールを加え、カラム処理に供する試料溶液とした。

#### 3) カラム処理

3 層ミニカラムをメタノール 10 mL で洗浄した。20 mL の全量フラスコを 3 層ミニカラムの下に置き、試料溶液 5 mL を正確にミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下してプロピレングリコールを流出させた。更にメタノール 10 mL を 3 層ミニカラムに加えて同様に流出させた。

更に全量フラスコの標線までメタノールを加え、GC-MS による測定に供する試料溶液とした。

## 4) GC-MS による測定

試料溶液及び各プロピレングリコール標準液各 1  $\mu$ L を GC-MS に注入し、選択イオン検出（以下「SIM」という。）クロマトグラムを得た。

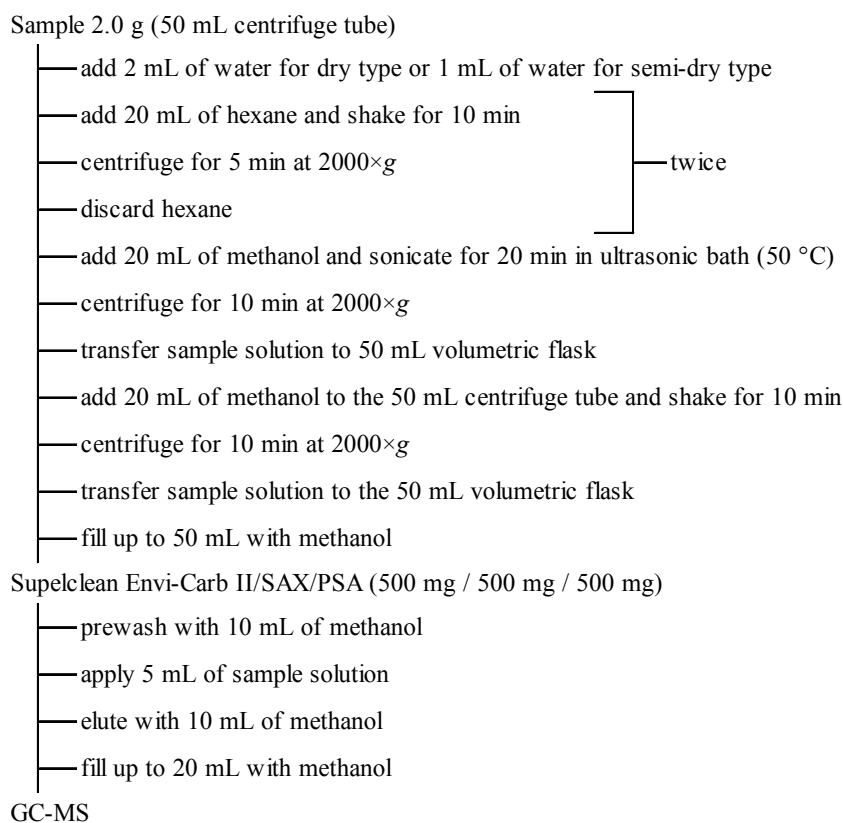
Table 2 Operating conditions of GC-MS

Column	DB-WAX (0.25 mm i.d. $\times$ 30 m, 0.25 $\mu$ m film thickness, Agilent Technologies)
Column temperature	60 $^{\circ}$ C (hold for 1 min) $\rightarrow$ ramp 5 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 145 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ ramp 30 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 250 $^{\circ}$ C (hold for 5 min)
Injection mode	Split (split ratio 1:50)
Injection temperature	250 $^{\circ}$ C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temperature	250 $^{\circ}$ C
Ion source temperature	230 $^{\circ}$ C
Ionization	Electron ionization (EI)
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	$m/z$ 61 (for quantification), 45 and 76 (for confirmation)

## 4) 計 算

得られた定量イオンの SIM クロマトグラムからプロピレングリコールのピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のプロピレングリコール量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for propylene glycol in dry and semi-dry type pet food by GC-MS

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

2.2 の 2) に従って調製した 1 mL 中にプロピレングリコールとして 5, 20, 40, 60, 80, 100 及び 120  $\mu\text{g}$  含有する各標準液各 1  $\mu\text{L}$  を GC-MS に注入し、得られた定量イオンの SIM クロマトグラムからプロピレングリコールのピーク面積を求めて検量線を作成した。得られた検量線は Fig. 2 のとおり 5~120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (注入量として 5~120 ng) の範囲で直線性を示した。

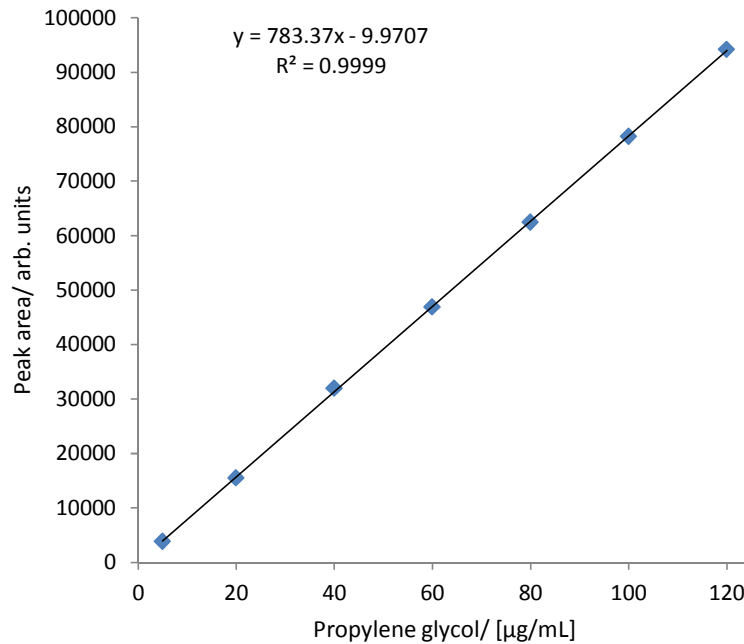


Fig. 2 Calibration curve of propylene glycol by peak area

### 3.2 JFRL 法からの変更点

GC カラムの液相は、水の存在下で温度を上げると急速に劣化する可能性がある。今回の検討の中で、同一の GC カラムを用いて 1500 回程度 GC-MS による測定をした結果、プロピレングリコールの保持時間が 1 min 程度早くなった。また、試料溶液の含水率が高くなるほど、ライナーの不活性処理剤の成分と考えられるピークが大きくなって検出された。水を含まない標準液を GC-MS に注入して測定した直後に、含水の試料溶液を注入して測定すると、プロピレングリコールのピークがかさ上げされる現象も認められた。これらのことから、水によるライナー等への影響を抑えるべきと考え、GC-MS に注入する水の量を減らすために JFRL 法に次の変更を加えた。

#### 1) 試料溶液の含水率を下げるための変更

##### i 脱脂工程での変更

分析試料の採取量を 5.0 g から 2.0 g に変更し、これに加える水の量を 5 mL からドライ製品では 2 mL に、セミドライ製品では 1 mL に変更した。

また、分析試料の採取量を減らしたことから、これを脱脂するためのヘキサン量を 30 mL から 20 mL に変更した。

ドライ製品では JFRL 法と同様に加水量を分析試料の量に対して同量としたが、セミドライ製品では、分析試料に同量の水を加えたとき、試料の粘性が高まりヘキサンと十分に混ざらなかつたため、分析試料の量に対して半量とした。JFRL 法の開発において、ドライ製品は加水によりプロピレングリコールの抽出率が向上したとしているが、ドライ製品で分析試料に同量の水を加えた場合とセミドライ製品で分析試料に半量の水を加えた場合、両者とも加水後の含水率は 50 %程度となることから、セミドライ製品に対する加水量を JFRL 法の半分としても問題ないと考えられた。原材料としてプロピレングリコールが添加されているセミドライ製品で加水量のみ換えて本法により定量した。その結果は Table 3 に示すとおり、



分析試料に同量の水と半量の水を加えた場合でプロピレングリコールの定量値への特段の影響は認められなかった。

Table 3 Quantitative value for propylene glycol by different quantity of water

		Quantity of water (mL)	
		1	2
Propylene glycol (mg/kg)	Run 1	21197	21180
	Run 2	20810	21122
	Run 3	21391	21162
	Mean	21133	21155

ii カラム処理工程での変更

カラム処理の際に、JFRL 法では抽出液をミニカラムに入れて得られた流出液を GC-MS による測定に供する試料溶液としている。これを抽出液 5 mL をミニカラムに入れて得られた流出液と、更にメタノール 10 mL をミニカラムに入れて得られた流出液を合わせた後に、メタノールで 20 mL に定容したものを試料溶液とするように変更した。

2) ミニカラムの変更

JFRL 法では GC-MS による測定に供する試料溶液に着色が認められる場合があったため、充てん剤にグラファイトカーボンを追加して色素を除去することとした。このため、用いるミニカラムをトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルとエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルを積層した 2 層ミニカラムから 3 層ミニカラムに変更した。

3) 3 層ミニカラムからの流出画分の確認

1)及び 2)によりカラム処理に変更を行ったことから、猫用ドライ製品を用い、2.4 の 1)及び 2)に従い抽出した液にプロピレングリコールとして 5000 mg/kg 相当量（最終試料溶液で 50 µg/mL 相当量）を添加し、50 mL の首太全量フラスコの標線までメタノールを加えて作製した試料溶液を 2.4 の 3)に従い 3 層ミニカラムに入れてミニカラムからの流出画分を確認した。その結果、Table 4 のとおり、プロピレングリコールはメタノール 0~10 mL の画分に 98.0 %以上流出し、その後の 10~15 mL の画分に微量の流出が認められた。このことから、試料溶液 5 mL を負荷、流出した後、更にメタノール 10 mL を加えてプロピレングリコールを流出させることとした。

Table 4 Elution pattern of propylene glycol from Supelclean Envi-Carb II /SAX/PSA

	Recovery <sup>a)</sup> (%)			Total
	Methanol			
	Load	Elution		
	0~5 mL	5~10 mL	10~15 mL	
Only standard solution	37.9	61.0	0.4	99.2
In the presence of matrix components of dry type for cats	41.2	61.4	0.3	103

a) n=1

1)の変更により、JFRL法に比べると、本法ではGC-MSに注入される水の量を減らすことができたが、定量値の精確さを維持するためには、50回程度のGC-MSへの注入ごとに新しい不活性処理されたライナーへの交換が必要であった。

### 3.3 妨害物質の検討

10種類のドライ製品の愛玩動物用飼料で、本法により調製した試料溶液をGC-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、全ての試料で妨害となるピークは認められなかった。

3種類のセミドライ製品の愛玩動物用飼料で、本法により調製した試料溶液をGC-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、全ての試料で妨害となるピークは認められなかった。なお、全ての試料で微少なプロピレングリコールのピークが確認された。検出したピークは、定量イオンと確認イオンとの強度比からプロピレングリコールと判断した。

### 3.4 添加回収試験

#### 1) ドライ製品

ドライ製品の分析試料に500及び5000 mg/kg相当量（最終試料溶液で5及び50 µg/mL相当量）のプロピレングリコールを添加し、本法により5点併行で定量して回収率及び繰返し精度を求めた。その結果はTable 5に示すとおり、プロピレングリコールの平均回収率は94.3~105%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD<sub>r</sub>）として4.3%以下であった。

Table 5 Recoveries of propylene glycol (dry type pet foods)

Pet food types	Spiked level (mg/kg)			
	500		5000	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Dry type for cats 1	105	1.1	98.9	1.3
Dry type for cats 2	101	1.1	98.5	1.8
Dry type for cats 3	103	2.8	101	1.5
Dry type for dogs 1	94.3	1.3	95.0	4.3
Dry type for dogs 2	100	1.3	104	0.8

a) Mean (n=5)

b) Relative standard deviation of repeatability

#### 2) セミドライ製品

セミドライ製品の分析試料に500及び5000 mg/kg相当量（最終試料溶液で5及び50 µg/mL相当量）のプロピレングリコールを添加し、本法により5点併行で定量して回収率及び繰返し精度を求めた。その結果はTable 6に示すとおり、プロピレングリコールは99.3~106%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD<sub>r</sub>）として2.1%以下であった。

Table 6 Recoveries of propylene glycol (semi-dry type pet foods)

Pet food types	Spiked level (mg/kg)					
	500			5000		
	Propylene glycol <sup>a)</sup> (mg/kg)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	Propylene glycol <sup>a)</sup> (mg/kg)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)
Semi-dry type for dogs 1	724	106	2.1	5337	103	0.9
Semi-dry type for dogs 2	815	102	0.7	5269	99.3	1.0

a) Mean ( $n=5$ )

b) Mean ( $n=5$ ); Blank values of propylene glycol were 196 mg/kg in semi-dry type for dogs 1 and 303 mg/kg in semi-dry type for dogs 2.

c) Relative standard deviation of repeatability

なお，得られた定量イオンの SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した.

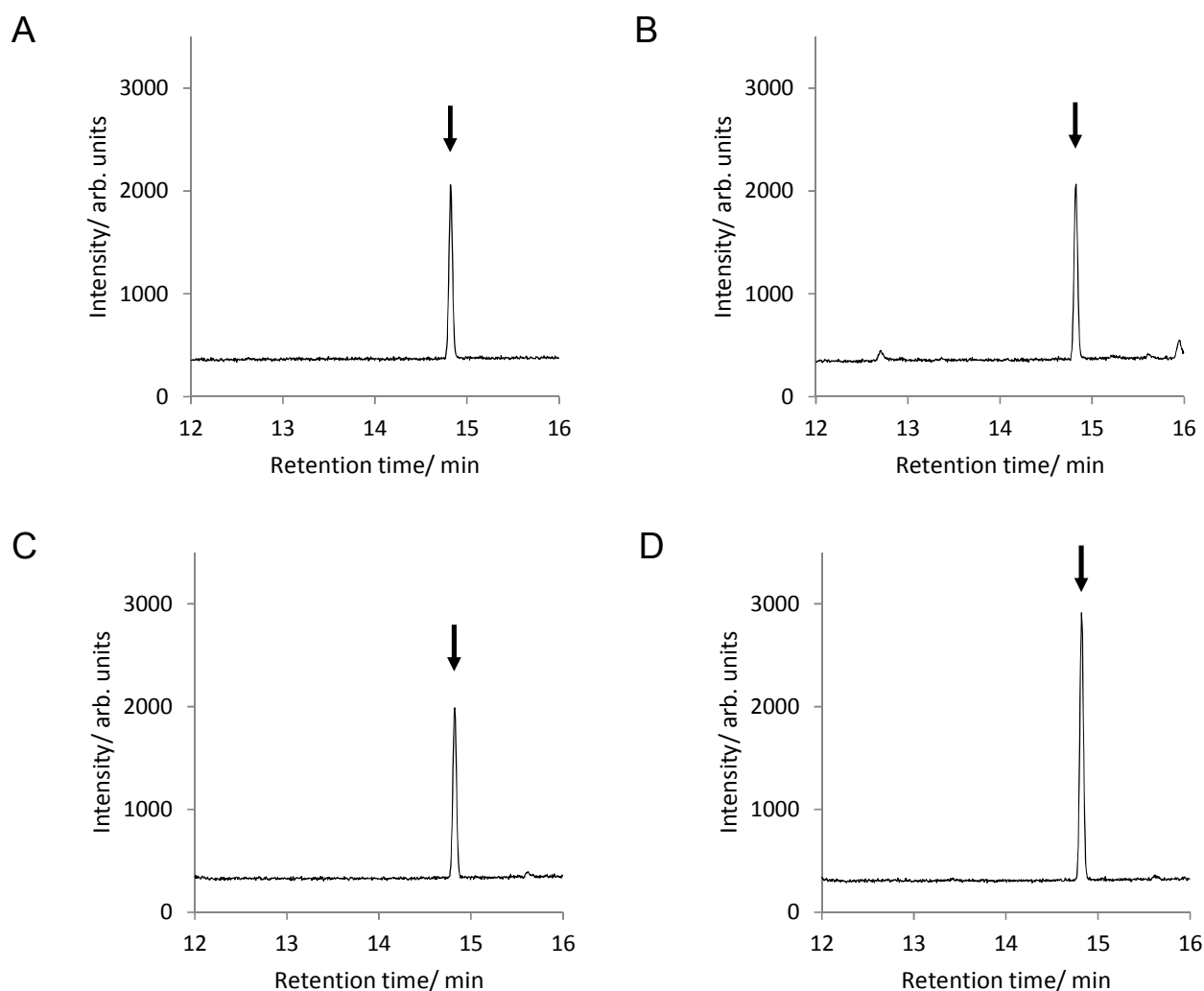


Fig. 3 Selected ion monitoring chromatograms of propylene glycol  
(Arrows indicate the peaks of propylene glycol.)

- A: Standard solution (5  $\mu\text{g/mL}$ : 5 ng as propylene glycol)  
 B: Sample solution of dry type pet food for cats spiked at 500 mg/kg of propylene glycol  
 (5  $\mu\text{g/mL}$  as propylene glycol)  
 C: Sample solution of dry type pet food for dogs spiked at 500 mg/kg of propylene glycol  
 (5  $\mu\text{g/mL}$  as propylene glycol)  
 D: Sample solution of semi-dry type pet food for dogs (blank value of propylene glycol: 196  
 mg/kg) spiked at 500 mg/kg of propylene glycol (6.96  $\mu\text{g/mL}$  as propylene glycol)

### 3.5 定量限界（下限）及び検出限界

本法の定量限界（下限）及び検出限界を確認するため、3.4の添加回収試験で調製した500 mg/kg相当量（最終試料溶液で5  $\mu\text{g/mL}$ 相当量）のプロピレングリコールを添加した試料溶液1  $\mu\text{L}$ をGC-MSに注入し、得られた定量イオンのSIMクロマトグラムからプロピレングリコールのピークの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500 mg/kgであった。また、SN比が3以上となる濃度は200 mg/kgとなった。

なお、Table 5及びTable 6に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良

好であった。

### 3.6 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の2点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、愛玩動物用飼料のドライ製品にプロピレングリコールとして 1000 mg/kg 及び 5000 mg/kg 相当量（分析用試料 2.0 g に対して 1 mL 中に 2 mg 及び 10 mg を含有する標準液を 1 mL）を、各試験室にて分析開始の前日にそれぞれ添加して調製した試料、並びにプロピレングリコールを含有したセミドライ製品の試料を用いた。参加試験室は、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所、一般財団法人食品環境検査協会東京事業所、一般財団法人日本冷凍食品検査協会関西事業所、JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部、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 11 試験室）であった。

#### 1) セミドライ製品の試料の均質性確認

セミドライ製品の試料の均質性確認については、Thompson らの harmonized protocol<sup>7)</sup>に基づき、ランダムに抜き取った 10 袋で各 2 点併行分析して行った。この分析結果を Table 7 に、また、その結果に基づく一元配置の分散分析結果を Table 8 に示した。分散比  $F_0$  は  $F$  境界値を下回り、有意水準 5 %において試料間に有意な差は認められず、この試験用試料の均質性に問題はないと判断した。

Table 7 Homogeneity test of the semi-dry type pet food for the collaborative study I

No. of sample	Propylene glycol	
	(mg/kg)	
1	2960	3020
2	2990	3010
3	3030	3030
4	2960	2920
5	3010	3040
6	2990	3060
7	3050	3050
8	3000	3000
9	3020	3060
10	2900	3020

Table 8 Homogeneity test of the semi-dry type pet food  
for the collaborative study II

Source	$S^a$	$\phi^b$	$V^c$	$F_0^d$	$F_{crit.}^e$
Between samples	22380	9	2487	1.82	3.02
Analytical error	13700	10	1370		
Total	36080	19			

a) Sum of squared deviation

b) Degree of freedom

c) Unbiased variance (Mean square)

d)  $F$  value calculated based on analysis of variance (ANOVA)

e)  $F$  critical value:  $F(9, 10; \alpha=0.05)$

## 2) 共同試験結果

共同試験結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>8), 9)</sup>を参考に、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、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度 ( $RSD_f$ ) 及び室間再現精度 ( $RSD_R$ ) を算出し、得られた  $RSD_R$  から、修正 Horwitz 式<sup>10)</sup>を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 9 のとおりであった。犬用ドライ及び猫用ドライについて平均回収率はそれぞれ 102 及び 98.6 %であり、犬用ドライ、犬用セミドライ及び猫用ドライについて  $RSD_f$  はそれぞれ 1.5, 2.5 及び 2.3 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 4.7, 4.5 及び 3.3 %, HorRat はそれぞれ 0.83, 0.95 及び 0.75 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 10 に示した。

Table 9 Collaborative study for propylene glycol

Lab. No.	Pet food types					
	Dry type for dogs (mg/kg)		Semi-dry type for dogs <sup>a)</sup> (mg/kg)		Dry type for cats (mg/kg)	
1	1070	1080	3700 <sup>c)</sup>	3840 <sup>c)</sup>	6250 <sup>c)</sup>	5870 <sup>c)</sup>
2	1020	1020	3260	3120	4740	4790
3	1090	1110	3220	3110	4980	4890
4	981	987	3380	3250	4980	5110
5	953	966	3270	3190	5210	5110
6	1090	1070	3280	3270	5090	5080
7	1040	1020	3220	3300	5020	4740
8	1030	975	3110	3090	4990	4700
9	909 <sup>b)</sup>	998 <sup>b)</sup>	3070	3080	4860	5080
10	990	984	2740	2980	4740	4650
11	1000	1010	3100	3090	4930	4930
Spiked level (mg/kg)	1000		—		5000	
Mean value <sup>d)</sup> (mg/kg)	1020		3160		4930	
Mean recovery <sup>d)</sup> (%)	102		—		98.6	
RSD <sub>r</sub> <sup>e)</sup> (%)	1.5		2.5		2.3	
RSD <sub>R</sub> <sup>f)</sup> (%)	4.7		4.5		3.3	
PRSD <sub>R</sub> <sup>g)</sup> (%)	5.6		4.8		4.4	
HorRat	0.83		0.95		0.75	

a) The sample containing propylene glycol

b) Data excluded by Cochran test

c) Data excluded by single Grubbs test

d)  $n=20$

e) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

f) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 10 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	GC column (i.d.×length, film thickness)
1	GC: FOCUS GC, Thermo ELECTRON MS: POLARIS Q, Thermo ELECTRON	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
2	GC: GC-2010, Shimadzu MS: GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
3	GC: GC-2010, Shimadzu MS: GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
4	GC: FOCUS GC, Thermo ELECTRON MS: POLARIS Q, Thermo ELECTRON	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
5	GC: GC-2010, Shimadzu MS: GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
6	GC: GC-2010, Shimadzu MS: GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
7	GC: CP-3800, VARIAN MS: 300-MS, VARIAN	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
8	GC: GC-2010, Shimadzu MS: GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-WAX, J&W Scientific (0.32 mm×30 m, 0.5 μm)
9	GC: 6840A, Agilent Technologies MS: 5973N, Agilent Technologies	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
10	GC: GC-2010, Shimadzu MS: GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
11	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-Wax, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)

#### 4 まとめ

愛玩動物用飼料（ドライ及びセミドライ製品）中のプロピレングリコールについて、JFRL 法を基に、GC-MS による定量法のペット検査法への適用の可否を検討したところ、GC-MS による測定に供する試料溶液の含水率を減らすように変更し、ミニカラムの充てん剤にグラファイトカーบอนを追加することにより、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 5~120 μg/mL（注入量として 5~120 ng）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、5 及び 50 μg/mL 相当濃度とした。

2) 本法に従って得られた定量イオンの SIM クロマトグラムでは、10 種類のドライ製品及び 3 種類のセミドライ製品の愛玩動物用飼料において定量を妨げるピークは認められなかった。

3) 本法に従い、5 点併行で定量して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。

4) 本法におけるプロピレングリコールの定量限界（下限）及び検出限界は、試料中で 500 mg/kg 及び 200 mg/kg であった。

5) 愛玩動物用飼料のドライ製品にプロピレングリコールとして 1000 mg/kg 及び 5000 mg/kg 相当量を添加した試料、並びにプロピレングリコールを含有したセミドライ製品の試料を用いて 11 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、良好な結果が得られた。



## 謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所，一般財団法人食品環境検査協会東京事業所，一般財団法人日本冷凍食品検査協会関西事業所及び JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部における関係者各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 厚生省告示：食品，添加物等の基準規格，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959).
- 2) 第 2 回農業資材審議会飼料分科会・中央環境審議会合同会合（ペットフード関連）：平成 20 年 12 月 24 日，資料 1 (2008).
- 3) 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).
- 4) 農林水産省消費・安全局長，環境省自然環境局長通知：愛がん動物用飼料の安全性の確保に関する法律の施行について，平成 21 年 5 月 29 日，21 消安第 2236 号，環自総発第 090529009 号 (2009).
- 5) 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).
- 6) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 25 年度愛玩動物用飼料安全確保体制強化委託事業（ペットフード中のプロピレングリコールの分析法開発）(2014).
- 7) Michael Thompson, Stephen L.R.Ellison, Roger Wood: The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78(1)**, 145-196 (2006).
- 8) William Horwitz: Protocol for design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67(2)**, 331-343 (1995).
- 9) AOAC Int. (2012). Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. In official methods of analysis of AOAC Int. 19 ed., Gaithersburg, MD, USA.
- 10) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

**技術レポート****1 かび毒の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による一斉分析法の植物性油かす類に対する妥当性確認**鈴木 知華<sup>\*1</sup>, 名塚 英一<sup>\*2</sup>, 加藤 耕一<sup>\*3</sup>, 青山 幸二<sup>\*1</sup>**Method Validations of the Simultaneous Determination Method of Mycotoxins by LC-MS/MS for Oil Meals**Chika SUZUKI<sup>\*1</sup>, Eiichi NAZUKA<sup>\*2</sup>, Koichi KATO<sup>\*3</sup> and Koji AOYAMA<sup>\*1</sup><sup>\*1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department<sup>\*2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center<sup>\*3</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

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

**1 緒 言**

飼料分析基準<sup>1)</sup>に既記載であるかび毒の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。）による一斉分析法（以下「本法」という。）は、適用範囲を飼料としており、単体飼料から配合飼料まで飼料全般を対象にした定量法となっている。しかし、分析法開発時には、大豆油かす等の植物性油かす類に対する妥当性を確認していない<sup>2)</sup>。そこで、そうこう類及び植物性油かす類の中から米ぬか油かす、コーングルテンミール、大豆油かす及びなたね油かすを選択し、本法のこれらの試料に対する妥当性を確認した。なお、本法の測定対象物質 16 成分のうち、主要な 9 成分（Table 1）のかび毒について試験を行った。

**2 実験方法****2.1 試 料**

米ぬか油かす、コーングルテンミール、大豆油かす及びなたね油かすをそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した。

**2.2 試 薬**

1) アセトニトリルは LC-MS 用を用いた。酢酸アンモニウム溶液は 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 LC 用（和光純薬工業製）を用いた。水は超純水（JIS K 0211 に定める 5218 の超純水）を用いた。

2) かび毒混合標準液

ステリグマトシスチン、デオキシニバレノール及びニバレノールについては、和光純薬工業

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

<sup>\*2</sup> 独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

<sup>\*3</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部， 現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

製標準品を正確に量って褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えたものを標準原液とした。各標準原液の濃度を Table 1 に示す。アフラトキシン B<sub>1</sub>、アフラトキシン B<sub>2</sub>、アフラトキシン G<sub>1</sub> 及びアフラトキシン G<sub>2</sub> は市販の混合標準液（各アフラトキシン 25 µg/mL, 和光純薬工業製）、ゼアラレノン及び T-2 トキシンは市販の標準液（100 µg/mL, 和光純薬工業製）を標準原液とした。

かび毒標準原液の一定量を混合し、アセトニトリル-水（21+4）で正確に希釈し低濃度及び高濃度かび毒混合標準原液を調製した。

使用に際して、低濃度及び高濃度かび毒混合標準原液をアセトニトリル-水（21+4）で正確に希釈し、更に各希釈液の一定量を同容量の酢酸（1+100）で希釈して Table 1 に示す濃度範囲の各検量線作成用かび毒混合標準液を調製した。

Table 1 Standard solutions of mycotoxins

Mycotoxins	Concentration of stock solution (µg/mL)	Concentration of mixed stock solutions		Range of concentration of mixed standard solutions for calibration		
		Lower (ng/mL)	Higher (ng/mL)	Lowest (ng/mL)	~	Highest (ng/mL)
Aflatoxin B <sub>1</sub>	25	50	200	0.125	~	1.0
Aflatoxin B <sub>2</sub>	25	50	200	0.125	~	1.0
Aflatoxin G <sub>1</sub>	25	50	200	0.125	~	1.0
Aflatoxin G <sub>2</sub>	25	50	200	0.125	~	1.0
Sterigmatocystin	50	50	100	0.125	~	0.5
Zearalenone	100	50	2500	0.125	~	12.5
T-2 toxin	100	400	800	1.0	~	4.0
Deoxynivalenol	100	2000	10000	5.0	~	50
Nivalenol	100	3000	4500	7.5	~	22.5

### 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-200 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機：レシプロシェーカーSR-2W（使用時回転数 300 rpm）
- 3) 多機能カラム：MultiSep 226 AflaZon+ Romer Labs 製
- 4) LC-MS/MS：

LC-MS/MS 1 LC 部：Nexera X2 島津製作所製

MS 部：LCMS-8040 島津製作所製

LC-MS/MS 2 LC 部：ACQUITY UPLC Waters 製

MS 部：ACQUITY Xevo TQD Waters 製

LC-MS/MS 3 LC 部：1200 Agilent Technologies 製

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

LC カラム：ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies 製

なお，大豆油かす及びなたね油かすは LC-MS/MS 1，米ぬか油かすは，LC-MS/MS 2，コーングルテンミールは LC-MS/MS 3 で測定した。

## 2.4 定量方法

飼料分析基準第 5 章第 3 節 1 の方法によった。ただし、試料採取量は 25.0 g、抽出溶媒量は 50 mL とした。

## 3 結果及び考察

### 3.1 添加回収試験

米ぬか油かす、コーングルテンミール、大豆油かす及びなたね油かすに各かび毒を添加した試料を用い、3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。なお、試料が不足するため採取量は 25.0 g とした。

その結果は Table 2 のとおり、米ぬか油かすについては、ステリグマトシスチン、T-2 トキシン、デオキシニバレノール及びニバレノールで低回収となった。コーングルテンミールについては、アフラトキシン B<sub>1</sub>、ステリグマトシスチン、T-2 トキシン及びニバレノールで低回収となった。大豆油かすについては、ニバレノールで低回収となった。なたね油かすについては、T-2 トキシン以外の 8 成分で低回収又は過回収となった。なお、LC-MS/MS 測定時のモニターイオンは、本法に示す例によるプリカーサーイオン及びプロダクトイオンを用いたが、米ぬか油かすの試験においてデオキシニバレノールのモニターイオン ( $m/z$ : 355 > 295) 及びニバレノールのモニターイオン ( $m/z$ : 371 > 281) において定量を妨害するピーク及びベースラインの乱れが認められ、定量が困難であったため、デオキシニバレノールではモニターイオン ( $m/z$ : 295 > 265) を、ニバレノールではモニターイオン ( $m/z$ : 311 > 281) を用いても測定を行った。これらの結果から、本法をそうこう類及び植物性油かす類に適用する場合、真度、精度等を確認する必要があることが示唆された。

Table 2 Recoveries for mycotoxins

Mycotoxins	Spiked level (µg/kg)	Feed types							
		Soybean meal		Rapeseed meal		Defatted rice bran		Corn gluten meal	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Aflatoxin B <sub>1</sub>	1	102	3.4	48.0	13	73.5	8.2	41.4	4.0
	4	106	6.2	41.4	2.2	73.1	3.0	46.1	3.0
Aflatoxin B <sub>2</sub>	1	102	3.9	32.8	20	71.4	18	74.4	4.5
	4	108	5.8	28.8	16	74.7	14	72.7	1.5
Aflatoxin G <sub>1</sub>	1	96.4	4.0	41.8	4.6	75.7	3.2	81.4	9.0
	4	93.9	1.3	29.8	16	75.8	5.4	74.0	3.2
Aflatoxin G <sub>2</sub>	1	90.4	6.5	0	—	78.9	13	88.1	16
	4	86.5	3.0	0	—	90.0	7.0	78.6	3.8
Sterigmatocystin	1	109	7.5	72.8	10	49.8	3.0	60.3	3.3
	2	97.9	3.6	62.3	2.8	47.9	1.7	54.1	5.8
Zearalenone	1	— <sup>c)</sup>	— <sup>c)</sup>	171	3.9	73.4	14	— <sup>c)</sup>	— <sup>c)</sup>
	50	103	4.9	98.0	1.1	105	0.9	119	13
T-2 toxin	8	99.3	4.8	74.3	3.6	70.0	2.9	68.7	2.2
	16	107	0.6	76.4	5.6	61.2	3.9	70.2	0.1
Deoxynivalenol	40	109	0.7	49.8	23	— <sup>f)</sup>	69.6 <sup>d)</sup>	— <sup>f)</sup>	7.2 <sup>d)</sup>
	200	99.2	1.5	61.6	2.7	90.1	59.3 <sup>d)</sup>	3.2	3.2 <sup>d)</sup>
Nivalenol	60	55.7	13	17.0	173	63.3	44.7 <sup>e)</sup>	57	8.5 <sup>e)</sup>
	90	57.8	9.1	71.4	26	87.8	67.1 <sup>e)</sup>	20	6.9 <sup>e)</sup>

Colored cells stand for recoveries of less than 70 % or more than 120 %, and RSD<sub>r</sub> of more than 20 %.

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

c) The test could not be conducted because of lack of uncontaminated samples.

d) The value of deoxynivalenol was determined by another monitor ion ( $m/z$ : 295 > 265).

e) The value of nivalenol was determined by another monitor ion ( $m/z$ : 311 > 281).

f) The determination could not be conducted because the baseline became unstable.

#### 4 まとめ

植物性油かす類について、かび毒の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による一斉分析法の妥当性を確認した結果、試料及びかび毒の組み合わせによっては回収率の低下等が認められた。

#### 文 献

- 1) 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 (2006).
- 2) 福中 理絵，平岡 久明：高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による飼料中の 11 種類のかび毒の一斉分析法，飼料研究報告，31，8-30 (2006).

**技術レポート**

## 2 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の妥当性確認 ～デルタメトリン異性体への適用～

松尾 信吾<sup>\*1</sup>, 榊原 良成<sup>\*2</sup>Validation Study on Analyte Expansion to the Simultaneous Determination Method of Pesticides  
in Feed by GC-MS for  $\alpha$ -R-Deltamethrin and *trans*-DeltamethrininShingo MATSUO<sup>\*1</sup> and Yoshinari SAKAKIBARA<sup>\*2</sup><sup>\*1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center,<sup>\*2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center  
(Now Fukuoka Regional Center))

### 1 緒 言

デルタメトリンは、ピレスロイド系殺虫剤であり、神経膜のイオン透過性を阻害し、殺虫効果を示すと考えられており、また、同様のピレスロイド系殺虫剤トラロメトリンの代謝物でもある<sup>1)</sup>。日本国内では農薬登録されていないが、海外では穀類、果樹、野菜等に広く使用されている。飼料中のデルタメトリンの基準値は、トラロメトリンとの総和として、穀類（えん麦、大麦、小麦、とうもろこし、マイロ及びライ麦）中で 1 mg/kg、牧草中で 5 mg/kg と規定されている<sup>2)</sup>。

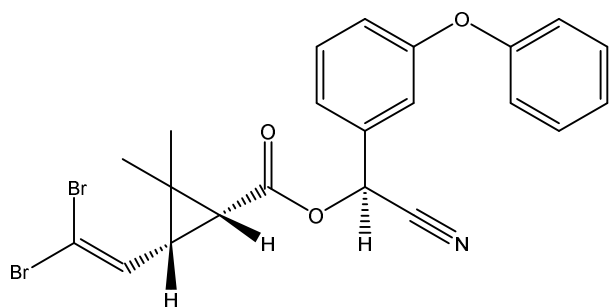
一方、食品安全委員会が平成 27 年に実施したデルタメトリン及びトラロメトリンに係る食品健康影響評価<sup>1)</sup>では、デルタメトリンの暴露評価対象物質の設定を代謝物として生じるデルタメトリン異性体の含量としている。このため、将来的に飼料中のデルタメトリン異性体の定量法が必要となる可能性がある。

飼料中のデルタメトリン及びトラロメトリンの定量法として、飼料分析基準<sup>3)</sup>に農薬のガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）による一斉分析法（以下「本法」という。）が規定されている。今回、本法の分析対象化合物に  $\alpha$ -R-デルタメトリン及び *trans*-デルタメトリン（以下「デルタメトリン異性体」という。）を追加するための妥当性確認を行ったのでその概要を報告する。

参考にデルタメトリンの化学構造式等を Fig. 1 に示した。

<sup>\*1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

<sup>\*2</sup> 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 福岡センター



Deltamethrin

(*S*)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl (1*R*,3*R*)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate  
 $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$  MW: 505.2 CAS No.: 52918-63-5

 $\alpha$ -*R*-Deltamethrin

(*R*)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl (1*R*,3*R*)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate  
 CAS No.: 55700-99-7

*trans*-Deltamethrin

(*S*)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl (1*R*,3*S*)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate  
 CAS No.: 64363-96-8

Fig. 1 Chemical structure of deltamethrin

## 2 実験方法

### 2.1 試料

配合飼料（ブロイラー肥育後期用，肉豚肥育用及び肉用牛肥育用），とうもろこし，大麦，小麦，マイロ，大豆及び乾牧草（チモシー乾草及びアルファルファ乾草）をそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。

なお，検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For finishing period broiler	Grains	64	Corn, polished rice, milo
	Oil seed meal	21	Soybean meal, rapeseed meal
	Animal by-products	5	Fish meal, poultry by-product meal
	Brans	1	Rice bran
	Others	9	Animal fat, calcium carbonate, salt, plum vinegar, betaine, calcium phosphate, food-processing by-product, feed additives
For growing pig	Grains	80	Corn, milo
	Oil seed meal	15	Rapeseed meal, soybean meal
	Brans	2	Rice bran
	Others	3	Animal fat, calcium carbonate, salt, calcium phosphate, silica, feed yeast, dried yeast cell wall, zeolite, Actinomycetes, humic acid, yucca powder, feed additives
For finishing beef cattle	Grains	88	Corn, barley
	Brans	11	Wheat bran
	Oil seed meal	1	Rapeseed meal
	Others		Calcium propionate

## 2.2 試薬

- 1) アセトニトリル, 酢酸エチル, ヘキサン, アセトン, シクロヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた. 2,2,4-トリメチルペンタンは液体クロマトグラフ用を用いた. ジエチレングリコールは鹿 1 級 (99.0 %以上のもの, 関東化学製) を用いた. 水は超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた.
- 2)  $\alpha$ -R-デルタメトリン標準原液  
 $\alpha$ -R-デルタメトリン標準品 (純度 98.0 %, Toronto Research Chemicals Inc.製) 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  $\alpha$ -R-デルタメトリン標準原液を調製した (この液 1 mL は,  $\alpha$ -R-デルタメトリンとして 0.5 mg を含有する. ) .
- 3) *trans*-デルタメトリン標準原液  
*trans*-デルタメトリン標準品 (純度 98.2 %, Clearsynth Labs Limited 製) 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線までアセトンを加えて *trans*-デルタメトリン標準原液を調製した (この液 1 mL は, *trans*-デルタメトリンとして 0.5 mg を含有する. ) .
- 4) デルタメトリン標準原液  
デルタメトリン標準品 (純度 99.0 %, 和光純薬工業製) 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線までアセトンを加えてデルタメトリン標準原液を調製した (この液 1 mL は, デルタメトリンとして 0.5 mg を含有する. ) .
- 5) デルタメトリン異性体混合標準液  
 $\alpha$ -R-デルタメトリン及び *trans*-デルタメトリン各標準原液 2.5 mL を 50 mL 全量フラスコに入れて混合し, 更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) を加えてデルタメトリン異性体混合標準原液を調製した (この液 1 mL は,  $\alpha$ -R-デルタメトリン及び *trans*-デルタメトリンとして各 20  $\mu$ g を含有する. ) . この液の一定量を, 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に  $\alpha$ -R-デルタメトリン及び *trans*-デルタメトリンとして 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5  $\mu$ g を含有するデルタメトリン異性体混合標準液を調製した.
- 6) デルタメトリン標準液  
デルタメトリン標準原液 2.5 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ, 更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) を加えて, 1 mL 中にデルタメトリンとして 20  $\mu$ g を含有する液を調製した. この液の一定量を, 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し, 1 mL 中にデルタメトリンとしてそれぞれ 0.02, 0.05, 0.2, 及び 0.5  $\mu$ g を含有するデルタメトリン標準液を調製した.

## 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機 : ZM-200 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)
- 2) 乾牧草用粉碎機 : SM-2000 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 835 rpm)
- 3) 振とう機 : 理研式シェーカー MW-DRV 宮本理研工業製 (使用時振動数 300 rpm)
- 4) 多孔性ケイソウ土カラム (20 mL 保持用) : Chem Elut, 20 mL Agilent Technologies 製
- 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 : ENVI-



Carb/LC-NH2 (500 mg/500 mg) Sigma-Aldrich 製

- 6) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム : Sep-Pak Plus Florisil cartridge (充てん剤量 910 mg) Waters 製に 10 mL のリザーバーを連結したもの
- 7) メンブランフィルター : DISMIC-25HP (孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , 直径 25 mm, PTFE) 東洋濾紙製
- 8) ゲル浸透クロマトグラフ : GPC システム ジーエルサイエンス製
- 9) GC-MS :
  - GC 部 : 7890A Agilent Technologies 製
  - MS 部 : 5975C Agilent Technologies 製

## 2.4 定量方法

飼料分析基準第 6 章第 3 節 1 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に従って定量した。GC-MS におけるモニターイオンは、一斉分析法におけるデルタメトリンと同じく  $m/z$  181 (定量イオン), 253 (確認イオン) とした。なお, *trans*-デルタメトリンのピークは、デルタメトリンのピークと分離することは出来なかったため, *trans*-デルタメトリンの定量は, *trans*-デルタメトリンの標準液及びデルタメトリン標準液で検量線を作成し定量した。

ゲル浸透クロマトグラフ及び GC-MS 測定条件を Table 2 及び Table 3 に、定量の概要を Scheme 1 にそれぞれ示した。

Table 2 Operating conditions of GPC

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d. $\times$ 300 mm, 15 $\mu\text{m}$ ), Showa Denko
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d. $\times$ 100 mm, 15 $\mu\text{m}$ ), Showa Denko
Eluent	Cyclohexane-acetone (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	60~150 mL

Table 3 Operating conditions of GC-MS

Column	DB-5MS+DG (0.25 mm i.d. $\times$ 30 m+10 m guard column, 0.25 $\mu\text{m}$ film thickness), Agilent Technologies
Column temperature	70 $^{\circ}\text{C}$ (hold for 1 min) $\rightarrow$ ramp 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $\rightarrow$ 150 $^{\circ}\text{C}$ $\rightarrow$ ramp 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $\rightarrow$ 200 $^{\circ}\text{C}$ $\rightarrow$ ramp 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $\rightarrow$ 280 $^{\circ}\text{C}$ (hold for 10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection port temperature	280 $^{\circ}\text{C}$
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temperature	250 $^{\circ}\text{C}$
Ion source temperature	230 $^{\circ}\text{C}$
Ionization	Electron ionization (EI)
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	$m/z$ 181 (for quantification), 253 (for confirmation)

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

- add 15 mL of water and allow to stand for 30 min
- add 100 mL acetonitrile and shake for 30 min
- filtrate under suction filter (No. 5B)
- wash with 50 mL of acetonitrile
- evaporate to the volume of 15 mL under 40 °C

## Chem Elut cartridge

- apply sample solution and allow to stand for 5 min
- wash with 100 mL of hexane-ethyl acetate (1:1)

## Hexane-ethyl acetate solution

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

## Gel permeation chromatography

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

ENVI-Carb/NH<sub>2</sub> cartridge (prewashed with 10 mL of ethyl acetate)

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

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

- apply 4.0 mL of sample solution
- elute with 6 mL of hexane-acetone (7:3)
- add a drop of acetone-diethylene glycol (49:1)
- evaporate to dryness under 40 °C
- dissolve in 2.0 mL of 2,2,4-trimethylpentane-acetone (4:1)

## GC-MS

**Scheme 1 Analytical procedure for simultaneous determination of pesticides  
in feeds by GC-MS**

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

2.2 の 5) に従って調製したデルタメトリン異性体混合標準液各 1 μL を GC-MS に注入し、得られた選択イオン検出 (以下「SIM」という.) クロマトグラムからピーク高さをを用いて検量線を作成した。得られた検量線の一例は、Fig. 2 のとおりであり、各デルタメトリン異性体は各

0.02~0.5  $\mu\text{g/mL}$  (注入量として 0.02~0.5 ng 相当量) の範囲で直線性を示した.

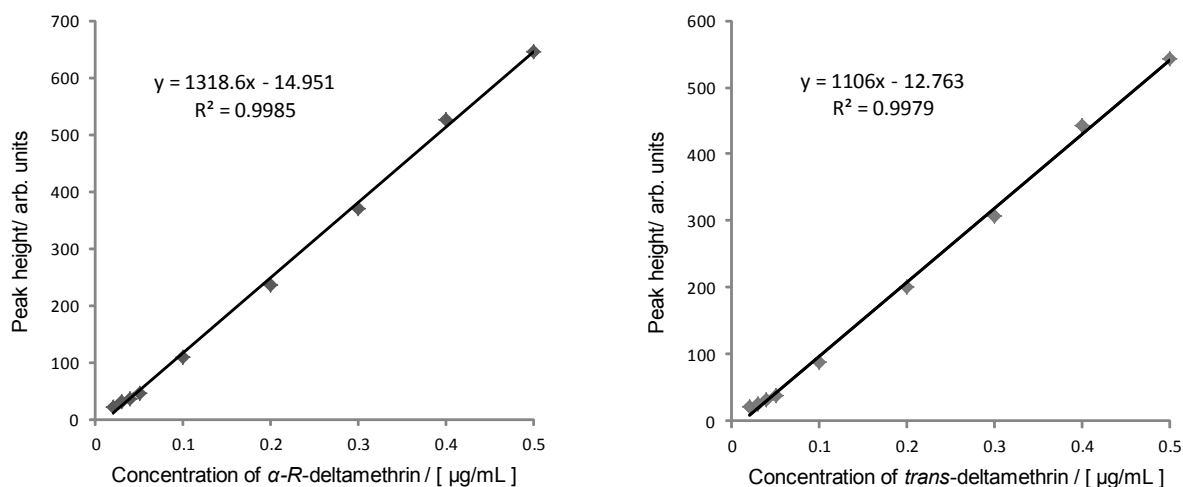


Fig. 2 Calibration curves of  $\alpha$ -R-deltamethrin (left) and *trans*-deltamethrin (right) by peak height

### 3.2 妨害物質の検討

配合飼料 3 種 (ブロイラー肥育後期用, 肉豚肥育用及び肉用牛肥育用), とうもろこし, 大麦, 小麦, マイロ, 大豆及び乾牧草 (チモシー乾草及びアルファルファ乾草) について, 本法により調製した試料溶液を GC-MS に注入し, 得られた SIM クロマトグラムを確認したところ, 定量を妨げるピークは認められなかった.

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

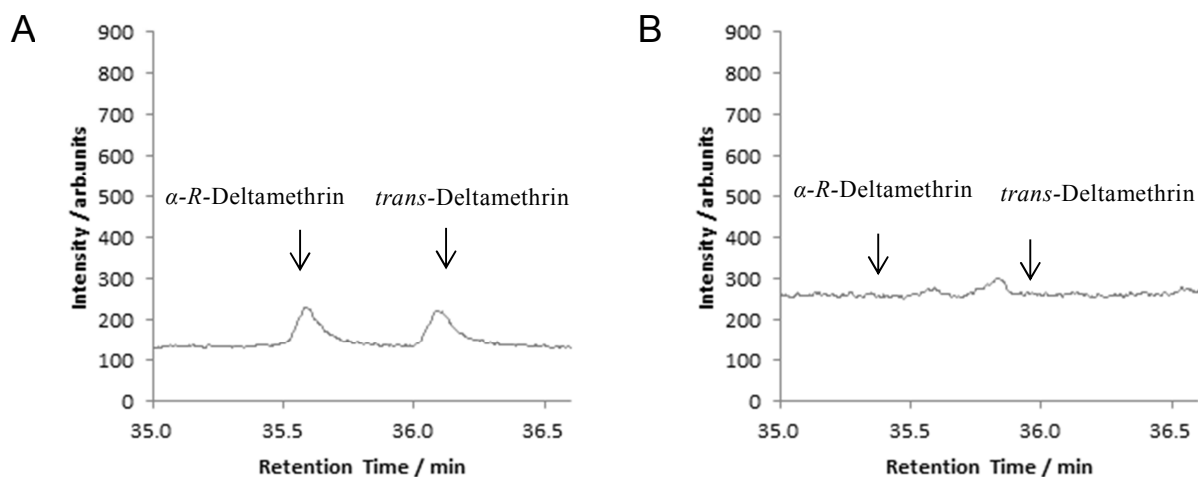


Fig. 3 Selected ion monitoring chromatograms of blank corn and standard solution (Scales of vertical-axis are the same between left and right chromatograms for each pesticide. Arrows indicate the retention time of pesticides.)

A: Standard solution (0.02  $\mu\text{g/mL}$ : 0.02 ng as each pesticide)

B: Corn (blank)

## 3.3 添加回収試験

デルタメトリン異性体について、肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしにそれぞれ 0.2 及び 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.1 µg/mL になるよう正確に希釈），チモシー乾草に 0.5 及び 5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.1 µg/mL になるよう正確に希釈）を添加し，本法により 3 点併行分析を実施して回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は，Table 4 のとおり， $\alpha$ -R-デルタメトリンについては平均回収率 101~201 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD<sub>r</sub>）として 11.1 %以下，*trans*-デルタメトリンについては平均回収率 106~205 %，その繰返し精度は RSD<sub>r</sub>として 13.9 %以下であった。また，*trans*-デルタメトリンをデルタメトリン標準液で検量線を作成し，定量した結果については，平均回収率 131~241 %，その繰返し精度は RSD<sub>r</sub>として 14.3 %以下であった。

なお，得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 4 Recoveries for  $\alpha$ -R-deltamethrin and *trans*-deltamethrin

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Formule feed for finishing beef cattle		Corn		Timothy	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
$\alpha$ -R- Deltamethrin	0.2	201	8.9	176	9.9	—	—
	0.5	—	—	—	—	196	6.9
	1	109	11.1	110	5.5	—	—
	5	—	—	—	—	101	6.7
<i>trans</i> - Deltamethrin <sup>c)</sup>	0.2	205	9.5	176	9.9	—	—
	0.5	—	—	—	—	203	9.2
	1	110	13.9	113	3.9	—	—
	5	—	—	—	—	106	5.8
<i>trans</i> - Deltamethrin <sup>d)</sup>	0.2	241	9.3	208	9.8	—	—
	0.5	—	—	—	—	239	8.8
	1	140	14.3	144	3.6	—	—
	5	—	—	—	—	131	9.5

—: Not tested

Colored cells stand for recoveries of more than 200 %

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Calculated with a calibration curve prepared by standard solution of *trans*-deltamethrin

d) Calculated with a calibration curve prepared by standard solution of deltamethrin

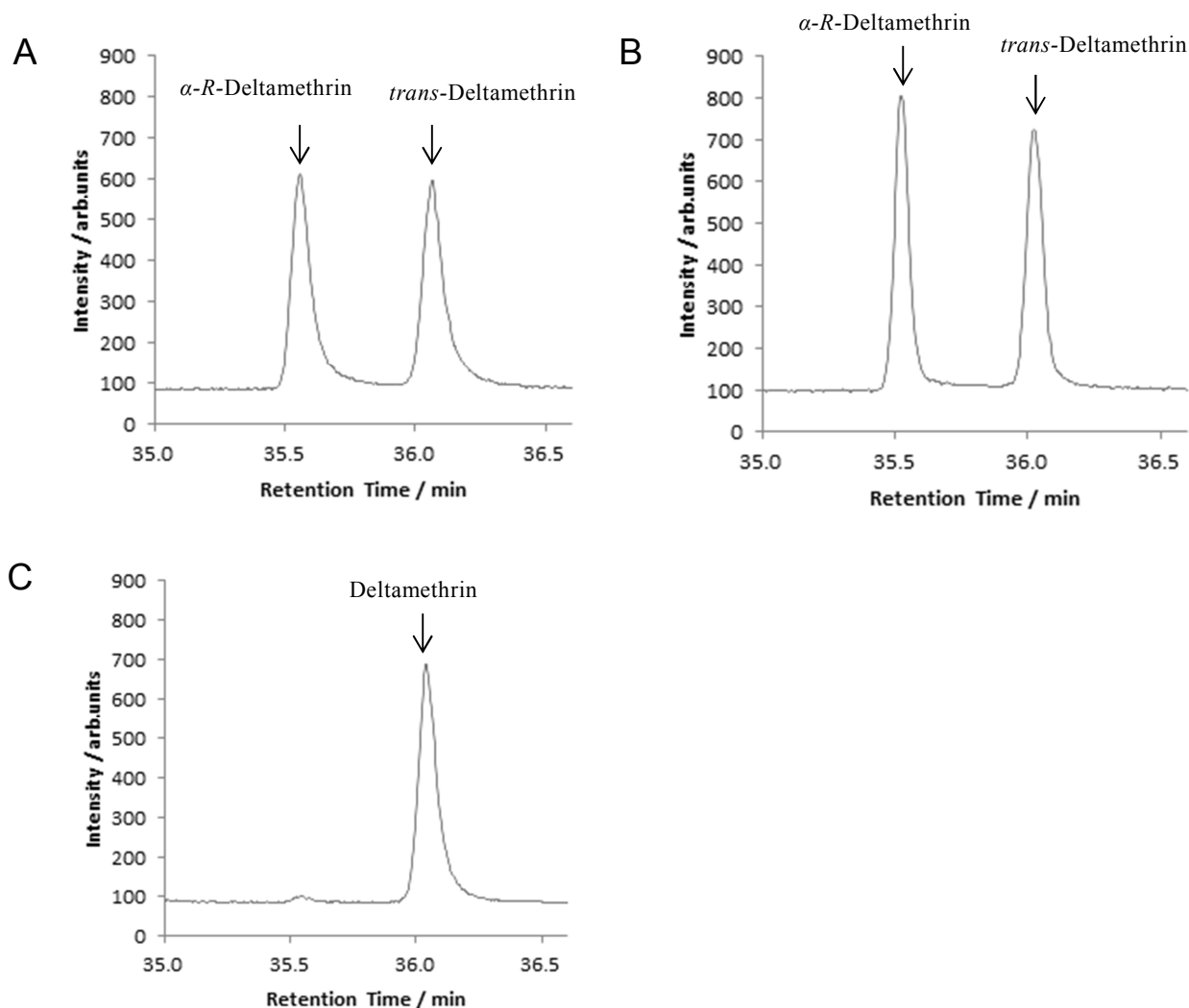


Fig. 4 Selected ion monitoring chromatograms

(Arrows indicate the peaks of  $\alpha$ -R-deltamethrin and *trans*-deltamethrin or deltamethrin)

A: Mixed standard solution of  $\alpha$ -R-deltamethrin and *trans*-deltamethrin (0.1  $\mu$ g/mL: 0.1 ng as each pesticide)

B: Sample solution of corn

Spiked at 1 mg/kg of  $\alpha$ -R-deltamethrin and *trans*-deltamethrin (0.1  $\mu$ g/mL as each pesticide: diluted sample solution 10-fold with 2,2,4-trimethylpentane-acetone (4:1))

C: Standard solution of deltamethrin (0.1  $\mu$ g/mL: 0.1 ng as deltamethrin)

### 3.4 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の2点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしにデルタメトリン異性体として 1 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 10  $\mu$ g を含有する標準液 1 mL 添加)、チモシー乾草には 5 mg/kg 相当量 (分析用試料 5 g に対して 1 mL 中に 25  $\mu$ g を含有する標準液 1 mL 添加) を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた。参加試験室は、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

及び同福岡センター（計4試験室）であった。結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>4), 5)</sup>を参考に、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、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度（RSD<sub>r</sub>）及び室間再現精度（RSD<sub>R</sub>）を算出し、得られたRSD<sub>R</sub>から、修正Horwitz式<sup>6)</sup>を用いてHorRatを求めた。

結果はTable 5, Table 6及びTable 7のとおりであった。*α-R*-デルタメトリンについて、肉用牛肥育用配合飼料は、平均回収率107%, RSD<sub>r</sub>19%, RSD<sub>R</sub>14%, HorRat0.88, とうもろこしは、平均回収率103%, RSD<sub>r</sub>14%, RSD<sub>R</sub>11%, HorRat0.66, チモシー乾草は、平均回収率89.5%, RSD<sub>r</sub>11%, RSD<sub>R</sub>9.0%, HorRat0.72であった。*trans*-デルタメトリンについて、肉用牛肥育用配合飼料は、平均回収率106%, RSD<sub>r</sub>19%, RSD<sub>R</sub>14%, HorRat0.87, とうもろこしは、平均回収率101%, RSD<sub>r</sub>11%, RSD<sub>R</sub>8.3%, HorRat0.52, チモシー乾草は、平均回収率86.4%, RSD<sub>r</sub>10%, RSD<sub>R</sub>7.6%, HorRat0.59であった。また、*trans*-デルタメトリンをデルタメトリン標準液で検量線を作成し、定量した結果については、肉用牛肥育用配合飼料は、平均回収率109%, RSD<sub>r</sub>13%, RSD<sub>R</sub>10%, HorRat0.60, とうもろこしは、平均回収率102%, RSD<sub>r</sub>7.7%, RSD<sub>R</sub>6.3%, HorRat0.40, チモシー乾草は、平均回収率88.9%, RSD<sub>r</sub>15%, RSD<sub>R</sub>11%, HorRat0.89であった。

参考のため、各試験室で使用したGC-MSの機種等をTable 8に示した。

Table 5 Collaborative study for of *α-R*-deltamethrin

Lab. No.	Feed types					
	Formula feed for finishing beef cattle		Corn		Timothy hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	1.19	1.19	1.17	1.17	4.68	5.06
2	1.05	0.928	0.969	1.03	4.42	4.91
3	1.20	1.19	1.04	0.977	4.39	4.20
4	0.854	0.972	1.00	0.868	3.85	4.29
Spiked level (mg/kg)	1		1		5	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	1.07		1.03		4.48	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	107		103		89.5	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	19		14		11	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	14		11		9	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	16		16		13	
HorRat	0.88		0.66		0.72	

a)  $n=8$

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 6 Collaborative study for *trans*-deltamethrin

Lab. No.	Feed types					
	Formula feed for finishing beef cattle		Corn		Timothy hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	1.18	1.19	1.09	1.12	4.76	4.65
2	1.02	0.954	0.977	1.06	4.12	4.55
3	1.20	1.17	1.01	0.906	4.06	3.87
4	0.861	0.933	0.974	0.905	4.19	4.34
Spiked level (mg/kg)	1		1		5	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	1.06		1.01		4.32	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	106		101		86.4	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	19		11		10	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	14		8.3		7.6	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	16		16		13	
HorRat	0.87		0.52		0.59	

a)  $n=8$ 

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 7 Collaborative study for *trans*-deltamethrin  
(Calculated with a calibration curve prepared by standard solution of deltamethrin)

Lab. No.	Feed types					
	Formula feed for finishing beef cattle		Corn		Timothy hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	1.07	1.19	0.989	1.01	4.32	4.21
2	1.01	0.944	0.977	1.06	4.12	4.55
3	1.22	1.19	1.02	0.921	4.13	3.94
4	1.08	1.04	1.11	1.09	5.34	4.94
Spiked level (mg/kg)	1		1		5	
Mean value <sup>a),b)</sup> (mg/kg)	1.09		1.02		4.44	
Mean recovery <sup>a),b)</sup> (%)	109		102		88.9	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	13		7.7		15	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	10		6.3		11	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	16		16		13	
HorRat	0.60		0.40		0.89	

a) Calculated as the amount of deltamethrin

b)  $n=8$

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 8 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	GC columnm
		(i.d×length, film thickness)
1	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
2	GCMS-QP2010, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
3	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
4	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-5MS+DG, Agilent Technologies (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm, Duraguard 10 m)

#### 4 まとめ

飼料中のデルタメトリン異性体について、飼料分析基準に収載の農薬の GC-MS による一斉分析法を基に、妥当性を確認したところ、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、0.02~0.5 μg/mL (注入量として 0.02~0.5 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。



- 2) とうもろこしについて、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 添加回収試験として、本法により 3 点併行分析を実施して回収率及び繰返し精度を求めたところ、その添加濃度及び結果は以下のとおりであった。

肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしにそれぞれ 1 mg/kg 相当量、チモシー乾草に 5 mg/kg 相当量を添加した添加回収試験では、良好な結果を得ることができた。一方、肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしに 0.2 mg/kg 相当量、チモシー乾草に 0.5 mg/kg 相当量を添加したところ、回収率は 200 %を超える結果となった。なお、その繰返し精度は 9.9 %以下であった。
- 4) 肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしにデルタメトリン異性体として 1 mg/kg 相当量、チモシー乾草 5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 4 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、良好な結果が得られた。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会：食品健康影響評価の結果の通知について，平成 27 年 1 月 13 日，府食第 25 号 (2015).
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 3) 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 (2006).
- 4) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 5) AOAC Int. (2012). Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. In *official methods of analysis of AOAC Int.* 19 ed., Gaithersburg, MD, USA.
- 6) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

## 技術レポート

### 3 モネンシンナトリウムの微生物学的試験法，液体クロマトグラフ法及び吸光光度法による定量法のほ乳期子牛育成用配合飼料に対する妥当性確認

関口 好浩<sup>\*1</sup>，嶋村 知紗<sup>\*1</sup>，大島 舞弓<sup>\*1</sup>，橋本 仁康<sup>\*2</sup>，  
奥村 寿章<sup>\*1</sup>，加藤 まどか<sup>\*3</sup>，三枝 尚子<sup>\*1</sup>，千原 哲夫<sup>\*2</sup>

#### Method Validations of Microbiological Assay, Liquid Chromatography and Absorptiometry for Determination of Monensin Sodium in Formula Feed for Suckling Calves

Yoshihiro SEKIGUCHI<sup>\*1</sup>, Chisa SHIMAMURA<sup>\*1</sup>, Mayu OSHIMA<sup>\*1</sup>, Yoshiyasu HASHIMOTO<sup>\*2</sup>,  
Toshiaki OKUMURA<sup>\*1</sup>, Madoka KATO<sup>\*3</sup>, Naoko SAEGUSA<sup>\*1</sup>, Tetsuo CHIHARA<sup>\*2</sup>

(<sup>\*1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

(<sup>\*2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department  
(Now Kobe Regional Center))

(<sup>\*3</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department  
(Now Nagoya Regional Center))

## 1 緒 言

モネンシンは，*Streptomyces cinnamonensis* の培養により得られるポリエーテル系の抗生物質である。我が国では，昭和 53 年に飼料安全法<sup>1)</sup>に基づき，飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進を目的に，飼料添加物としてモネンシンナトリウム（以下「MN」という。）が指定された<sup>2)</sup>。

MN は，成分規格等省令<sup>3)</sup>で鶏（ブロイラーを除く。）用（幼すう用・中すう用）及びブロイラー用（前期用，後期用）飼料に 80 g(力価)/t，また牛用（肥育期用，幼令期用）飼料に 30 g(力価)/t の含有量で添加することが認められている。新たに，MN は，平成 27 年 12 月 7 日付けで，牛用（ほ乳期用）飼料（主として離乳後の牛の育成の用に供する配合飼料であって，脱脂粉乳を主原料とするもの以外のもの。）（以下「ほ乳期子牛育成用配合飼料」という。）に 30 g(力価)/t の含有量で添加することが認められた<sup>4)</sup>。

配合飼料中の MN の定量法としては，飼料分析基準<sup>5)</sup>に微生物学的試験法（平板法）（以下「微生物学的試験法」という。）及び液体クロマトグラフ法が収載されており，農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知<sup>6)</sup>に迅速定量法として吸光光度法が定められている。しかし，これらの試験法は，その検討当時，MN のほ乳期子牛育成用配合飼料への添加が認められていなかったため，ほ乳期子牛育成用配合飼料に対する妥当性確認等が行われていない。

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

<sup>\*2</sup> 独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 神戸センター

<sup>\*3</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 名古屋センター

今回、ほ乳期子牛育成用配合飼料中の MN に対して微生物学的試験法を適用し、その妥当性を確認したので、その概要を報告する。また、液体クロマトグラフ法及び吸光光度法についても妥当性を確認し、更に3法の同等性を評価したので、併せて報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試料

#### 1) MN 製剤

表示力価が 200 mg(力価)/g の製剤を用いた。

#### 2) 希釈剤

粒径が 1 mm 以下の米ぬか油かすを用いた。

#### 3) ほ乳期子牛育成用配合飼料

抗菌性物質が添加されていない市販のほ乳期子牛育成用配合飼料 5 種類をそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機 (ZM-200 Retsch 製 (使用時回転数 14000 rpm)) を用いて粉碎した。各配合飼料の配合割合等を表 1 に示した。

#### 4) 分析試料

乳鉢を用いて MN 製剤を希釈剤と混合し、MN として 20 mg(力価)/g の希釈試料とした。さらに V 型混合機 (筒井理化学器械製, 缶体容量 2 L) を用いてこれを希釈剤と混合 (30 rpm, 15 分間) し、MN として 2 mg(力価)/g の希釈試料とした。同様にこの希釈試料と各配合飼料を混合し、MN として 15, 30 及び 45 g(力価)/t 含有するほ乳期子牛育成用配合飼料をそれぞれ調製した。

表 1 検討に用いた配合飼料の配合割合等

飼料の種類	原材料の区分	配合割合 (%)	原材料名
A ほ乳期子牛育成用・若令牛育成用・めん羊等用配合飼料	穀類	53	とうもろこし, 末粉, デキストリン
	植物性油かす類	34	大豆油かす, コーングルテンミール
	そうこう類	10	ふすま, 米ぬか
	その他	3	炭酸カルシウム, 植物性油脂, 食塩, リン酸カルシウム, 無水ケイ酸, 飼料添加物
B ほ乳期子牛育成用配合飼料	穀類	49	とうもろこし, 大麦, きな粉, 小麦粉
	植物性油かす類	28	大豆油かす, コーングルテンミール, なたね油かす
	そうこう類	9	ふすま
	その他	14	糖蜜, ビートパルプ, アルファルファミール, 炭酸カルシウム, 食塩, リン酸カルシウム, 飼料添加物
C ほ乳期子牛育成用配合飼料	穀類	54	とうもろこし, えん麦, ライ麦
	植物性油かす類	28	大豆油かす, なたね油かす
	そうこう類	9	コーングルテンフィード
	動物質性飼料	2	乾燥ホエー
	その他	7	糖蜜, りんごジュースかす, 炭酸カルシウム, 食塩, パン酵母培養液, 飼料添加物
D ほ乳期子牛育成用配合飼料	穀類	44	とうもろこし, ライ麦
	植物性油かす類	28	大豆油かす, なたね油かす
	そうこう類	21	コーングルテンフィード, 米ぬか, ふすま
	動物質性飼料	3	乾燥ホエー
	その他	4	炭酸カルシウム, 糖蜜, 食塩, トルラ酵母, サッカロマイセス・セレビスエ酵母, 飼料添加物
E ほ乳期子牛育成用配合飼料	穀類	60	加熱処理とうもろこし, とうもろこし, 加熱処理えん麦, 加熱処理大麦, マイロ, エクストルーダー処理大豆, 小麦粉, 玄米, でん粉
	植物性油かす類	29	大豆油かす
	そうこう類	3	ふすま, 米ぬか
	その他	8	糖蜜, アルファルファミール, 炭酸カルシウム, 食塩, 飼料用酵母, パン酵母, 麹菌, 甘草抽出物, ステビア, パナナ粉末, 無水ケイ酸, クエン酸, カシューナッツ殻油, トレハロース, 飼料添加物

## 2.2 微生物学的試験法

### 2.2.1 試薬

1) 水は、特記した場合を除き蒸留水（JIS K 0211 の 5213 に定義された蒸留水）を高圧蒸気滅菌器を用いて 121 °C で 15 分間滅菌（以下「高圧蒸気滅菌」という。）したものをを用いた。試薬は、特記した場合を除き特級を用いた。

#### 2) 緩衝液

##### i 3号緩衝液

飼料分析基準に準じて調製した。

##### ii 5号緩衝液

飼料分析基準に準じて調製した。

## 3) 抽出溶媒

メタノール-水 (9+1)

## 4) 各標準液等

常用標準品は、成分規格等省令<sup>3)</sup>の規定に基づき独立行政法人農林水産消費安全技術センターが指定した標準製剤を用いた。

## i モネンシン標準液

常用標準モネンシン (974.13  $\mu\text{g}$ (力価)/mg) 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のモネンシン標準原液を調製した。

使用に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、モネンシン標準液を調製した。高濃度標準液は2  $\mu\text{g}$ (力価)/mL に、低濃度標準液は0.5  $\mu\text{g}$ (力価)/mL に調製した。

妨害物質の検討に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、0.2, 1 及び 5  $\mu\text{g}$ (力価)/mL の各モネンシン標準液を調製した。

## ii バシトラシン標準液

常用標準バシトラシン (78.7 単位/mg) 適量を真空定温乾燥器を用いて 0.67 kPa 以下、60 °C で 3 時間乾燥 (以下「減圧乾燥」という。) した後、40 mg 以上を正確に量り、3 号緩衝液を正確に加えて溶かし、100 単位/mL のバシトラシン標準原液を調製した。

妨害物質の検討に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、0.04, 0.2 及び 1 単位/mL の各バシトラシン標準液を調製した。

## iii オキシテトラサイクリン標準液

常用標準オキシテトラサイクリン (922  $\mu\text{g}$ (力価)/mg) 40 mg 以上を正確に量り、塩酸 (0.01 mol/L) を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のオキシテトラサイクリン標準原液を調製した。

妨害物質の検討に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、0.2, 1 及び 5  $\mu\text{g}$ (力価)/mL の各オキシテトラサイクリン標準液を調製した。また、標準原液の一定量を抽出溶媒で正確に希釈し、10 及び 20  $\mu\text{g}$ (力価)/mL のオキシテトラサイクリン標準液を調製した。

## iv クロルテトラサイクリン標準液

常用標準クロルテトラサイクリン (921  $\mu\text{g}$ (力価)/mg) 適量を減圧乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、水を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のクロルテトラサイクリン標準原液を調製した。

妨害物質の検討に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、0.2, 1 及び 5  $\mu\text{g}$ (力価)/mL の各クロルテトラサイクリン標準液を調製した。また、標準原液の一定量を抽出溶媒で正確に希釈し、10 及び 20  $\mu\text{g}$ (力価)/mL のクロルテトラサイクリン標準液を調製した。

## v コリスチン標準液

常用標準コリスチン (703  $\mu\text{g}$ (力価)/mg) 適量を減圧乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、5 号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のコリスチン標準原液を調製した。

妨害物質の検討に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、

0.2, 1 及び 5 µg(力価)/mL の各コリスチン標準液を調製した。

5) 塩基性アルミナ

榎本ら<sup>7)</sup>の検討に基づき、カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ (Aluminium oxide 90 active basic, 0.063-0.200 mm, Merck Millipore 製) を乾燥器を用いて 130 °C で 2 時間乾燥し、気密容器に入れ、塩基性アルミナ 94 g に対して水 6 mL を加えてよく混和した後、一夜静置し、Brockmann スケール<sup>8)</sup>の活性度 III (水分 6 v/w%) に調整した。

6) F-22 号培地

飼料分析基準に準じて調製した。

7) 孢子液

試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 $1 \times 10^7$  CFU/mL の孢子液を調製した。

8) 寒天平板

高圧蒸気滅菌した後、49~51 °C に保温した F-22 号培地に、孢子液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加えて十分にかき混ぜ、その 10 mL をペトリ皿 (内径 90 mm, 高さ 20 mm) に一様に広がる様に分注した後、水平に静置して凝固させ、平板とした。円筒投下機を用い、平板上の半径 25 mm の円周上の相隣する各々が中心に対して 90°の間隔となる位置に、4 個の円筒 (外径 8 mm, 内径 6 mm, 高さ 10 mm, ステンレス製) を置いた。

### 2.2.2 装置及び器具

1) 阻止円測定装置 : ZONE ANALYZER ZA-F システムサイエンス製

2) ノギス : Digimatic Caliper ミットヨ製

### 2.2.3 定量方法

1) 抽出

分析試料の一定量 (MN として 0.3 mg(力価)相当量又は 10.0 g) を正確に量って 100 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 50 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて 20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過し、ろ液をカラム処理に供した。

2) カラム処理

塩基性アルミナ 12 g をカラム管 (内径 14 mm) に乾式で充てんし、カラムを調製した。

1)のろ液をカラムに入れ、初めの流出液 5 mL を捨てた。その後の流出液の一定量を水で正確に 3 倍希釈し、高濃度試料溶液 (0.3 mg(力価)相当量採取の場合は 2 µg(力価)/mL, 10 g 採取の場合は 1~3 µg(力価)/mL) を調製し、更にこれを水-メタノール (7+3) で正確に 4 倍希釈し、低濃度試料溶液 (0.3 mg(力価)相当量採取の場合 0.5 µg(力価)/mL, 10 g 採取の場合は 0.25~0.75 µg(力価)/mL) を調製した。

3) 分注及び培養

寒天平板 5 枚を用い、飼料分析基準第 9 章第 1 節 C の 1)に準じ、高濃度及び低濃度の標準液並びに試料溶液をそれぞれ 250 µL ずつ各円筒に分注し、恒温器を用いて 10 °C で 2 時間静置した後、37 °C で 16~20 時間培養した。

4) 阻止円直径の測定及び計算

飼料分析基準第 9 章第 1 節 C の 1)に準じて、阻止円測定装置又はノギスを用いて阻止円直径を測定し、2-2 用量法に基づき計算を行って飼料中の MN 濃度を求めた。

## 2.3 液体クロマトグラフ法

### 2.3.1 試薬

- 1) 水は、超純水（JIS K 0211 に定める 5218 に定義された超純水）を用いた。メタノールは、モネンシン標準原液の調製に用いたもの以外は液体クロマトグラフ用を用いた。その他の試薬は、特級を用いた。
- 2) モネンシン標準液  
2.2.1 の 4)の i)により調製したモネンシン標準原液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に希釈し、0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 及び 15  $\mu\text{g}(\text{力価})/\text{mL}$  の各モネンシン標準液を調製した。
- 3) 抽出溶媒　メタノール-水 (9+1)

### 2.3.2 装置及び器具

- 1) メンブランフィルター：エキクロディスク 13CR　日本ポール製（孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , PTFE）
- 2) 液体クロマトグラフ装置  
オートサンプラー：SIL-20AC　島津製作所製  
溶離液用ポンプ：LC-20AD　島津製作所製  
カラム恒温槽：CTO-20A　島津製作所製  
反応液用ポンプ：LC-20AD　島津製作所製  
反応槽：CRB-6A　島津製作所製  
紫外可視吸光光度検出器：SPD-20AV　島津製作所製

### 2.3.3 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、抽出溶媒 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて 20 分間かき混ぜて抽出した。抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過した後、さらにメンブランフィルターでろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。
- 2) 液体クロマトグラフィー  
試料溶液及び各モネンシン標準液各 20  $\mu\text{L}$  を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得た。測定条件を表 2 に示した。  
なお、MN は MN-A, MN-B, MN-C 及び MN-D の混合物であるが、飼料添加物として指定されているものは MN-A を主成分とするものであり、早川ら<sup>9)</sup>による液体クロマトグラフ法における MN 定量法の検討と同様、本法では、MN-A を定量物質とした。
- 3) 計算  
得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の MN 濃度を求めた。

表 2 液体クロマトグラフ法の測定条件

カラム	Shim-pack VP-ODS (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 $\mu$ m), 島津製作所製
溶離液	メタノール-水-酢酸 (94:6:0.1)
検出器	紫外可視吸光度検出器 (520 nm)
反応液 <sup>a)</sup>	メタノール-硫酸-バニリン (95:2:3, v/v/w)
流速	溶離液 0.6 mL/min, 反応液 0.6 mL/min
温度	カラムオープン 40 °C, 反応槽 95 °C
反応コイル	内径 0.5 mm, 長さ 5 m

a) 用時調製し, 遮光容器に入れて使用

## 2.4 吸光光度法

### 2.4.1 試薬

1) 水は, 蒸留水 (JIS K 0211 の 5213 に定義された蒸留水) を高圧蒸気滅菌したものをを用いた. 試薬は, 特記した場合を除き特級を用いた. エタノールは, JIS K 8101 に定めるエタノール (99.5) の特級を用いた.

#### 2) 各標準液

##### i モネンシン標準液

常用標準モネンシン 20 mg(力価) 相当量を正確に量り, エタノールを正確に加えて溶かし, 400  $\mu$ g(力価)/mL のモネンシン標準原液を調製した.

使用に際して, 標準原液の一定量をエタノールで正確に希釈し, 6  $\mu$ g(力価)/mL のモネンシン標準液を調製した. また, 妨害物質の検討に際しては, 標準原液の一定量をエタノールで正確に希釈し, 3 及び 6  $\mu$ g(力価)/mL のモネンシン標準液を調製した.

##### ii バシトラシン標準液

常用標準バシトラシン適量を減圧乾燥した後, 40 mg 以上を正確に量り, エタノール-水 (4+1) を正確に加えて溶かし, 100 単位/mL のバシトラシン標準原液を調製した.

妨害物質の検討に際して, 標準原液の一定量をエタノールで正確に希釈し, 0.42 及び 0.84 単位/mL のバシトラシン標準液を調製した.

##### iii オキシテトラサイクリン標準液

常用標準オキシテトラサイクリン 40 mg 以上を正確に量り, エタノール-水 (4+1) を正確に加えて溶かし, 1 mg(力価)/mL のオキシテトラサイクリン標準原液を調製した.

妨害物質の検討に際して, 標準原液の一定量をエタノールで正確に希釈し, 5 及び 10  $\mu$ g(力価)/mL オキシテトラサイクリン標準液を調製した.

##### iv クロルテトラサイクリン標準液

常用標準クロルテトラサイクリン適量を減圧乾燥した後, 40 mg 以上を正確に量り, エタノール-水 (4+1) を正確に加えて溶かし, 1 mg(力価)/mL のクロルテトラサイクリン標準原液を調製した.

妨害物質の検討に際して, 標準原液の一定量をエタノールで正確に希釈し, 5 及び 10  $\mu$ g(力価)/mL のクロルテトラサイクリン標準液を調製した.

##### v コリスチン標準液

常用標準コリスチン適量を減圧乾燥した後, 40 mg 以上を正確に量り, 水を正確に加え



て溶かし、1 mg(力価)/mL のコリスチン標準原液を調製した。

妨害物質の検討に際して、標準原液の一定量をエタノールで正確に希釈し、2 及び 4 µg(力価)/mL のコリスチン標準液を調製した。

3) 硫酸-エタノール溶液

エタノール 30 mL に硫酸 1 mL を徐々に加え、さらにエタノールを加えて 100 mL としたものを用時調製した。

4) *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液

*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド 600 mg を量り、エタノール 50 mL を加えて溶かした後、硫酸 1 mL を徐々に加え、更にエタノールを加えて 100 mL とした。用時調製した。

#### 2.4.2 装置及び器具

1) 恒温水槽：TRW-42TP アズワン製

2) 紫外可視分光光度計：UVmini 1240 島津製作所製

#### 2.4.3 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、エタノール 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて 10 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過し、試料溶液とした。

2) 発色

試料溶液 10 mL を 50 mL の共栓試験管 A、B 及び C にそれぞれ入れ、試験管 A 及び B にエタノール 5 mL、試験管 C にモネンシン標準液 5 mL をそれぞれ加えた。さらに試験管 A に硫酸-エタノール溶液 5 mL、試験管 B 及び C に *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液 5 mL をそれぞれ加えた。これらを混合した後、恒温水槽を用いて 70±1 °C で 20 分間加温して発色させた。

3) 測定

室温で 30 分間放冷した後、試験管 A、B 及び C 中の溶液を、エタノールを対照液として、紫外可視分光光度計を用いて波長 578 nm でそれぞれの吸光度 *a*、*b* 及び *c* を測定した。同時に、試料と同一の原料組成の MN 無添加対照試料について、上記と同様の操作を行い、吸光度 *a'*、*b'* 及び *c'* を測定した。

4) 計算

次式により試料中の MN 濃度を算出した。

$$\text{試料中の MN 濃度 (g(力価)/t)} = \left(\frac{b-a}{c-b}\right) \times 30 - \left(\frac{b'-a'}{c'-b'}\right) \times 30$$

### 3 結果及び考察

#### 3.1 微生物学的試験法

##### 3.1.1 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を検証するため、添加回収試験を実施した。

1) 試料採取量をモネンシン添加濃度に対応した量とした場合

採取する試料の量を MN 添加濃度に対応した量とした場合の定量値の確認を行った。2.1

の4)の分析試料をMNとして0.3 mg(力価)相当量 (MN含有量 15, 30 及び 45 g(力価)/tの各試料について, それぞれ 20, 10 及び 6.67 g) 量り, 本法に従って日を変えて3回分析を実施し, その回収率を求めた. 結果は表3のとおり, 平均回収率は91.7~105.9%, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub>) として8.3%以下と良好な結果であった.

## 2) 試料採取量を一定の10 gとした場合

添加濃度に関わらず, 採取する試料の量を一定の10 gとした場合の定量値の確認を行った. MN含有量15及び45 g(力価)/tの試料について, それぞれ10 g量り, 本法に従って1回分析を実施した. その結果は表4のとおり, 回収率は97.1~104.3%であった. また, ここで得られた回収率及び3.1.1 1)で得られた平均回収率について *t*-検定を行ったところ, MN含有量15 g(力価)/tの試料では  $t(4) = 0.47$ ,  $p = 0.66$ , MN含有量45 g(力価)/tの試料では  $t(4) = 2.5$ ,  $p = 0.066$  で, 有意差は認められなかった. このことから, 飼料中のMN含有量が15~45 g(力価)/tの範囲において, 試料採取量を一定の10 gとしても定量可能であることが確認できた.

表3 微生物学的試験法によるMNの添加回収試験結果 (試料採取量: 0.3 mg(力価)相当)

添加濃度 (g(力価)/t)	A		B		C		D		E	
	回収率 <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	回収率 <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	回収率 <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	回収率 <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	回収率 <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
15	99.1	5.9	103.9	3.2	105.0	2.8	105.9	8.3	91.7	1.8
30	98.6	2.3	102.4	1.9	102.9	5.3	105.7	6.4	96.4	2.0
45	105.1	5.7	101.7	2.3	102.0	5.2	103.5	0.8	99.6	4.3

a)  $n=3$  の平均値

b) 繰返し精度の相対標準偏差

表4 微生物学的試験法によるMNの添加回収試験結果  
(試料採取量: 10 g)

添加濃度 (g(力価)/t)	回収率 <sup>a)</sup> (%)				
	A	B	C	D	E
15	97.1	104.3	101.7	101.3	97.1
45	99.0	100.6	100.8	100.2	98.8

a)  $n=1$

### 3.1.2 妨害物質の検討

現在, 飼料添加物に指定されている抗生物質のうち, 牛用配合飼料においてMNとの併用が認められているのは, 亜鉛バシトラシン (以下「BC」という.), 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 (以下「OTC」という.), クロルテトラサイクリン (以下「CTC」という.), 硫酸コリスチン (以下「CL」という.) である. 過去の妨害物質の検討において, 小山<sup>10)</sup>がプレミックス中の抗生物質の微生物学的試験法の検討をした際に, OTC及びCTCは*Bacillus subtilis* ATCC 6633に対して感受性があるが, カラムクロマトグラフィーによる精製の段階で塩基性アルミナに吸着されるため, MNの定量を妨害しないことを確認している.

今回、ほ乳期子牛育成用配合飼料に対して MN との併用が認められている BC, OTC, CTC 及び CL が、MN の定量を妨害する可能性について確認した。

モネンシン (0.2, 1, 5  $\mu\text{g}$ (力価)/mL) , バシトラシン (0.04, 0.2, 1 単位/mL) , オキシテトラサイクリン (0.2, 1, 5  $\mu\text{g}$ (力価)/mL) , クロルテトラサイクリン (0.2, 1, 5  $\mu\text{g}$ (力価)/mL) 及びコリスチン (0.2, 1, 5  $\mu\text{g}$ (力価)/mL) の各標準液を用い、2.2.3 の 3)及び 4)の方法に準じて試験を実施した。その結果、BC 及び CL は試験を実施した濃度範囲では、阻止円が認められなかったことから、併用されても MN の定量を妨害しないことが確認できた。しかし、小山の結果と同様に、図 1 のとおり、OTC は 5  $\mu\text{g}$ (力価)/mL の濃度で、CTC は 1 及び 5  $\mu\text{g}$ (力価)/mL の濃度で阻止円が認められたが、それ以下の濃度では阻止円が認められなかった。なお、ほ乳期子牛育成用配合飼料に MN と各抗生物質が併用された場合に、MN の最終試料溶液中には、BC で 0.01~0.28 単位/mL, OTC で 0.33~3.33  $\mu\text{g}$ (力価)/mL, CTC で 0.17~3.33  $\mu\text{g}$ (力価)/mL, CL で 0.33~1.33  $\mu\text{g}$ (力価)/mL 含まれることとなる。

そこで、OTC 及び CTC について、ほ乳期子牛育成用配合飼料への最大添加濃度 (OTC, CTC 共に 50 g(力価)/t) 及びその 2 倍濃度を含む試料からの抽出濃度となるよう調製した標準液 (OTC, CTC 共に 10 及び 20  $\mu\text{g}$ (力価)/mL) を用い、2.2.3 の方法に準じて試験を実施した。その結果、OTC 及び CTC は、小山の結果と同様に、共に阻止円が認められず、カラムクロマトグラフィーによる精製の段階で塩基性アルミナに吸着され、MN の定量を妨害しないことが確認できた。

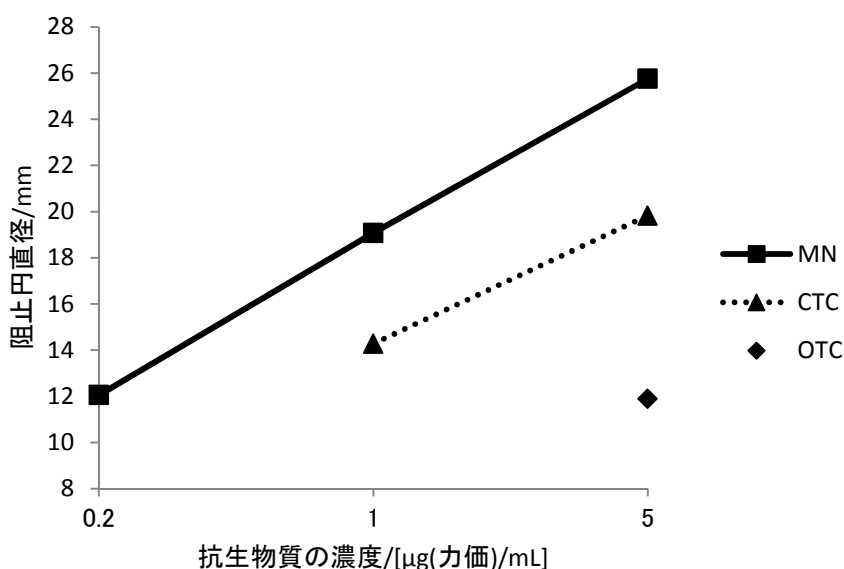


図 1 MN, OTC 及び CTC の感受性曲線

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 :  $0.5 \times 10^5$  CFU/mL (F-22 号培地, 円筒法)

CTC 0.2  $\mu\text{g}$ (力価)/mL, OTC 0.2 及び 1  $\mu\text{g}$ (力価)/mL では阻止円が認められなかった。

### 3.2 液体クロマトグラフ法

#### 3.2.1 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を検証するため、添加回収試験を実施した。

2.1 の 4)の分析試料について、それぞれ本法に従って 3 回分析を実施し、回収率を求めた。結果は表 5 のとおり、平均回収率は 93.3~98.2 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 2.7 %以下と、良好な結果であった。

表 5 液体クロマトグラフ法による MN の添加回収試験結果

添加濃度 (g(力価)/t)	A		B		C		D		E	
	回収率 <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	回収率 <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	回収率 <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	回収率 <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	回収率 <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)
15	94.4	2.2	94.9	1.8	93.3	0.9	94.9	1.0	95.1	1.9
30	98.2	1.2	97.7	2.3	95.4	0.9	96.9	1.4	93.8	1.3
45	96.0	1.0	95.3	1.0	96.5	2.7	96.6	0.5	96.1	1.2

a)  $n=3$  の平均値

b) 繰返し精度の相対標準偏差

### 3.2.2 妨害物質の検討

早川ら<sup>9)</sup>が液体クロマトグラフによる MN の定量法を検討した際、配合飼料に添加可能な抗生物質（当時、飼料添加物に未指定で未検討のナラシン（以下「NR」という。）を除く。）は、MN の定量を妨害しないことを確認している。また、千原<sup>11)</sup>は、液体クロマトグラフによる NR の定量法を検討した際、MN と NR のピークの分離状況は良好で、MN は NR の定量を妨害しないことを確認している。これらのことから、NR は MN の定量を妨害しないと考えられた。

なお、2.1 の 3)に示したほ乳期子牛育成用配合飼料 5 種類について、本法に従って分析したところ、定量を妨害するピークは認められなかった。ほ乳期子牛育成用配合飼料 C のクロマトグラムを図 2 に示した。

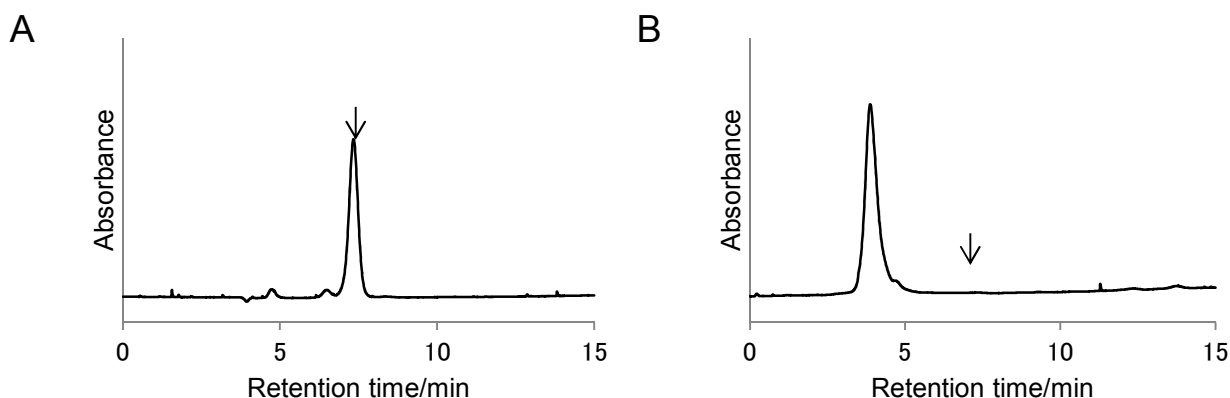


図 2 MN 標準液と MN 無添加飼料のクロマトグラム  
(縦軸のスケールは左右のクロマトグラムで同じ。

矢印は MN-A の保持時間を示す。)

A : 標準液 (1  $\mu\text{g}$ (力価)/mL : MN として 20 ng(力価) )

B : ほ乳期子牛育成用配合飼料 C (ブランク)

### 3.3 吸光光度法

#### 3.3.1 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を検証するため、添加回収試験を実施した。

2.1 の 4)の分析試料について、それぞれ本法に従って3回分析を実施し、回収率を求めた。結果は表6のとおり、平均回収率は89.9~95.8%，その繰返し精度はRSD<sub>r</sub>として5.3%以下と、良好な結果であった。

表6 吸光光度法によるMNの添加回収試験結果

添加濃度 (g(力価)/t)	A		B		C		D		E	
	回収率 <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	回収率 <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	回収率 <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	回収率 <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	回収率 <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
15	93.8	3.0	94.6	1.6	95.8	5.3	92.6	2.0	94.0	1.7
30	93.5	1.1	93.6	2.9	91.5	1.0	92.9	3.4	89.9	0.5
45	92.9	0.9	90.8	0.9	91.4	3.1	92.4	1.1	90.4	1.2

a) n=3 の平均値

b) 繰返し精度の相対標準偏差

#### 3.3.2 妨害物質の検討

ほ乳期子牛育成用配合飼料へのMNとの併用が認められているBC, OTC, CTC及びCLが、MNの定量を妨害する可能性について確認した。

BC, OTC, CTC及びCLについて、ほ乳期子牛育成用配合飼料への最大添加濃度（BC：420万単位/t, CL：20g(力価)/t, OTC：50g(力価)/t, CTC：50g(力価)/t）及びその2倍濃度を含む試料からの抽出濃度となるよう調製した各標準液を用い、2.4.3に準じて、試験管Bに係る試料溶液を各標準液に代えて実施し、各抗生物質とp-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液との反応による発色の有無を確認した。また、陽性対照としてMN、ブランクとしてエタノールについても、同様の操作を行った。その結果は表7のとおり、各抗生物質の吸光度はブランクの吸光度とほぼ同じ値であり、MNとの併用が認められている抗生物質は、MNの定量を妨害しないことが確認できた。

表7 MN との併用が認められている各抗生物質の吸光度

抗生物質		濃度	吸光度 <sup>a)</sup>
BC	最大	0.42 単位/mL	0.0025
	最大の2倍	0.84 単位/mL	0.0027
OTC	最大	5.0 µg(力価)/mL	0.0021
	最大の2倍	10 µg(力価)/mL	0.0021
CTC	最大	5.0 µg(力価)/mL	0.0019
	最大の2倍	10 µg(力価)/mL	0.0018
CL	最大	2.0 µg(力価)/mL	0.0021
	最大の2倍	4.0 µg(力価)/mL	0.0020
MN	最大	3.0 µg(力価)/mL	0.1458
	最大の2倍	6.0 µg(力価)/mL	0.2924
ブランク		—	0.0030

a)  $n=3$  の平均値

## 3.4 3法の評価及び定量値の比較

表3, 5及び6のとおり, 各試験法による添加回収試験の回収率及びその繰返し精度の結果から, 3法共に試験法の妥当性が確認できた。

また, 液体クロマトグラフ法及び吸光光度法の試験結果が微生物学的試験法の試験結果と差がないことを確認するため, それぞれの平均回収率について  $t$ -検定を行った。その結果は表8のとおり, MN含有量 15 g(力価)/t の試料については共に有意差はなかったが, 30及び45 g(力価)/t の試料については有意差が認められた。しかし, 前述のとおり妥当性の確認結果は良好であり, 実用上は問題ないと判断した。

表8  $t$ -検定の結果

添加濃度 (g(力価)/t)	分析法の組み合わせ	自由度	検定統計量	$p$ 値
15	微生物学的試験法 - 液体クロマトグラフ法	4	2.37	0.077
	微生物学的試験法 - 吸光光度法	4	2.64	0.057
30	微生物学的試験法 - 液体クロマトグラフ法	4	3.08	0.037
	微生物学的試験法 - 吸光光度法	4	6.18	0.003
45	微生物学的試験法 - 液体クロマトグラフ法	4	6.85	0.002
	微生物学的試験法 - 吸光光度法	4	22.76	0.000

## 4 まとめ

ほ乳期子牛育成用配合飼料中のモネンシンナトリウムに対して微生物学的試験法、液体クロマトグラフ法及び吸光光度法を適用し、その妥当性を確認し、3法の同等性を評価したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 飼料分析基準に記載されている微生物学的試験法による添加回収試験を5種類のほ乳期子牛育成用配合飼料について実施した結果、平均回収率は91.7~105.9%、その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として8.3%以下であった。また、併用可能な亜鉛バシトラシン、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及び硫酸コリスチンは、モネンシンナトリウムの定量を妨害しないことが確認できた。
- 2) 飼料分析基準に記載されている液体クロマトグラフ法による添加回収試験を5種類のほ乳期子牛育成用配合飼料について実施した結果、平均回収率は93.3~98.2%、その繰返し精度は  $RSD_r$  として2.7%以下であった。また、定量を妨害するピークは確認されなかった。
- 3) 通知に規定されている吸光光度法による添加回収試験を5種類のほ乳期子牛育成用配合飼料について実施した結果、平均回収率は89.9~95.8%、その繰返し精度は  $RSD_r$  として5.3%以下であった。また、併用可能な亜鉛バシトラシン、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及び硫酸コリスチンは、モネンシンナトリウムの定量を妨害しないことが確認できた。
- 4) 微生物学的試験法、液体クロマトグラフ法及び吸光光度法の3法の試験結果に有意差が認められたが、各試験法による添加回収試験の回収率及びその繰返し精度の結果から、いずれの試験法もほ乳期子牛育成用配合飼料への適用が可能と考えられた。

## 文 献

- 1) 法律：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(1953)。
- 2) 農林省告示：飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律の規定に基づき飼料添加物を定める件，昭和51年7月24日，農林省告示第750号(1976)。
- 3) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和51年7月24日，農林省令第35号(1976)。
- 4) 農林水産省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令，平成27年12月7日，農林水産省令第82号(2015)。
- 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) 農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について，昭和53年9月5日，53畜B第2173号・53水振第464号(1978)。
- 7) 榎本 舞弓，橋本 仁康，山多 利秋：ポリエーテル系抗生物質の微生物学的定量法に用いる塩基性アルミナについて，飼料研究報告，40，150-157(2015)。
- 8) Hans Brockmann, Hella Schodder.: Aluminiumoxyd mit abgestuftem adsorptionsvermögen zur chromatographischen adsorption, Chem. Ber., 74, 73-78(1941)。

- 9) 早川 俊明, 牧野 大作 : 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のモネンシンナトリウムの定量, 飼料研究報告, **26**, 60-68 (2001).
- 10) 小山 敬之 : プレミックス中の抗生物質の定量法の検討, 飼料研究報告, **6**, 163-326 (1980).
- 11) 千原 哲夫 : 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のナラシンの定量, 飼料研究報告, **27**, 94-101 (2002).



**技術レポート****4 愛玩動物用飼料等の検査法収載法のスナック製品等への適用のための妥当性確認**～ ゼアラレノン, フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> 並びにプロピレングリコール ～野村 昌代<sup>\*1</sup>, 伊藤 千晶<sup>\*1</sup>, 設楽 賢治<sup>\*1</sup>, 保田 伊世<sup>\*1</sup>,  
小塚 健志<sup>\*1</sup>, 新井 詠子<sup>\*2</sup>, 高橋 亜紀子<sup>\*1</sup>**Validation Study on Application of Analytical Methods of Zearalenone,  
Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>, and Propylene Glycol to Snack Type Pet Foods**Masayo NOMURA<sup>\*1</sup>, Chiaki ITO<sup>\*1</sup>, Kenji SHIDARA<sup>\*1</sup>, Iyo YASUDA<sup>\*1</sup>, Kenji KOZUKA<sup>\*1</sup>, Eiko ARAI<sup>\*2</sup>  
and Akiko TAKAHASHI<sup>\*1</sup><sup>\*1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department<sup>\*2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department  
(Now Sendai Regional Center)**1 緒 言**

独立行政法人農林水産消費安全技術センターが定める「愛玩動物用飼料等の検査法」（以下「検査法」という。）<sup>1)</sup>に収載する分析法については、従来、流通量及び摂食量の多い、ドライ、セミドライ及びウェット製品といった総合栄養食等主食的に用いられるものを先行して整備を進めてきたが、平成 25 年 10 月、米国 FDA において、中国産ジャーキーに起因すると推測される犬猫への原因不明の健康被害が発生しているとの公表<sup>2)</sup>が発表されたことを受け、スナック製品 5 分類（成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）への適用範囲拡大のための妥当性確認についても実施している。

平成 27 年度は、ドライ、セミドライ及びウェット製品を適用範囲として検査法に収載されているかび毒（ゼアラレノン並びにフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub>）の分析法並びにドライ及びセミドライ製品を適用範囲として検査法に収載されている添加物（プロピレングリコール）の分析法について、スナック製品 5 分類への分析法適用のための妥当性確認を実施したので、その概要を報告する。

今回検討のゼアラレノン及びフモニシンについては、現在のところ我が国において、愛玩動物用飼料中の含有許容値は設定されていない。プロピレングリコールについては、愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令<sup>3)</sup>において、猫を対象とする販売用愛玩動物用飼料に用いてはならないとされている。

**2 実験方法****2.1 試 料**

市販のスナック製品 5 分類（成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフト

---

<sup>\*1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部<sup>\*2</sup> 独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 仙台センター

タイプ) , 菓子類及び粉ミルク) を試料に用い, 検査法に準じて分析用試料を調製した. すなわち, 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎 (粒度が 1 mm 以下であった粉ミルクを除く.) し, 混合し用いた.

検討に用いた試料の分類, 種類及びその原材料名を表 1-1~1-3 に示した. なお, 原材料名は, 検討に用いた各試料に表記されていた名称に準拠した.

表 1-1 検討に用いた試料の分類, 種類及びその原材料名  
(ゼアラレノンの分析法の検討)

分類	種類	原材料名
成型ジャーキー (水分20 ~ 35 %程度)	犬用成型ジャーキー	肉類(鶏ササミ等), でん粉類, 豆類, 糖類, ミネラル類(塩化ナトリウム), 増粘安定剤(ソルビトール, グァーガム), 保存料(ソルビン酸カリウム, デヒドロ酢酸ナトリウム), pH調整剤(ソルビン酸, デヒドロ酢酸ナトリウム), 調味料, 発色剤(亜硝酸ナトリウム), 消臭剤(ポリアクリル酸ナトリウム), 食用色素(カaramel, 赤106), ビタミンE
	猫用成型ジャーキー	鶏ササミ, 食塩, ソルビトール, グリセリン, リン酸塩(Na), 酸化防止剤(V.C), 発色剤(亜硝酸Na)
素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ. 水分10 ~ 15 %程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)	鶏ササミ, グリセリン, 砂糖, 塩, デヒドロ酢酸ナトリウム
素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ. 水分25 %程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)	鶏ささみ, じゃがいもでん粉, グルコサミン, オリゴ糖, グリセリン, プロピレングリコール, 塩化Na
菓子類	犬用ビスケット	小麦粉, 砂糖, 植物油, タピオカでん粉, 野菜(ほうれん草, にんじん, カボチャ), ミルクパウダー, チョリ抽出物(食物繊維, オリゴ糖含有), 膨張剤, ミネラル類(カルシウム, ナトリウム), 香料, ユッカエキス, 食用色素(黄4, 黄5, 青1)
粉ミルク	犬用粉ミルク	乾燥乳清蛋白質濃縮物, 乾燥乳清粉末, 動物性油脂, 植物性油脂, ブドウ糖, レシチン, タウリン, デンプン, ラクトフェリン, プロバイオティクス( <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ), 香料, ケイ素, ビタミン類(ビタミンA, ビタミンB <sub>1</sub> 塩酸塩, ビタミンB <sub>2</sub> , ビタミンB <sub>6</sub> 塩酸塩, グリシン酸鉄, パントテン酸カルシウム, 硫酸第一鉄, 硫酸銅, 硫酸マンガン, 亜セレン酸ナトリウム, 酸化亜鉛, 硫酸コバルト)

表 1-2 検討に用いた試料の分類, 種類及びその原材料名  
(フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> の分析法の検討)

分類	種類	原材料名
成型ジャーキー (水分20 ~ 35 %程度)	犬用成型ジャーキー	肉類(鶏ササミ等), 野菜類(にんじん, グリンピース等), でん粉類, 豆類, 増粘安定剤(グリセリン, グァーガム), 保存料(デヒドロ酢酸ナトリウム)
	猫用成型ジャーキー	マグロ, 鶏肉, 脱脂大豆, 牛肉, でん粉類, 小麦たん白, 豚脂, 酵母, 食塩, オリゴ糖, ソルビトール, 膨張剤, 調味料, ミネラル類(Ca, P), リン酸塩(Na, K), 乳酸Na, 酸化防止剤(ビタミンC), 保存料(ソルビン酸), ビタミン類(E, A), 乳酸Ca, 発色剤(亜硝酸Na)
素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ. 水分10 ~ 15 %程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)	鶏ササミ, グリセリン, 砂糖, 塩, デヒドロ酢酸ナトリウム
素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ. 水分25 %程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)	鶏ささみ, じゃがいもでん粉, グルコサミン, オリゴ糖, グリセリン, プロピレングリコール, 塩化Na
菓子類	犬用ビスケット	小麦粉, 還元麦芽糖, 植物性油脂, でん粉類, オリゴ糖, 膨張剤, 香料, 保存料(プロピオン酸Ca)
粉ミルク	犬用粉ミルク	粉乳(脱脂粉乳, カゼイン), 油脂類(植物性油脂, 動物性油脂, $\gamma$ -リノレン酸), 卵黄粉末, 大豆たん白, オリゴ糖, L-カルニチン, ミネラル類(Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), 乳化剤, ビタミン類(A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , D, E, K, ニコチン酸, パントテン酸, 葉酸, コリン), 香料, タウリン

表 1-3 検討に用いた試料の分類、種類及びその原材料名  
(プロピレングリコールの分析法の検討)

分類	種類	原材料名
成型ジャーキー (水分20～35%程度)	犬用成型ジャーキー	鶏ササミ, でんぷん類, 大豆たん白, 食塩, 炭酸Ca, グリセリン, リン酸Na
	猫用成型ジャーキー	鶏ササミ, 食塩, ソルビトール, グリセリン, リン酸塩(Na), 酸化防止剤(V.C), 発色剤(亜硝酸Na)
素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ. 水分10～15%程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)	肉類(鶏ササミ等), 増粘安定剤(ソルビトール), 保存料(デヒドロ酢酸ナトリウム)
素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ. 水分25%程度)	犬用素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)	鶏ササミ, 食塩, グリセリン, 保存料(ソルビン酸K), 酸化防止剤(エリソルビン酸Na)
菓子類	犬用ビスケット	小麦粉, マーガリン, グラニュー糖, 鶏卵, 米胚芽・大豆発酵抽出物, 樹木抽出物, ガラクトオリゴ糖, たんぱく質濃縮ホエイパウダー(乳製品), 脱脂粉乳, 乳糖, 植物油, 甘味料(D-ソルビトール), 炭酸カルシウム, 緑茶抽出物, 酸化防止剤(ビタミンE, ローズマリー抽出物)
粉ミルク	犬用粉ミルク	粉乳(脱脂粉乳, カゼイン), 油脂類(植物性油脂, 動物性油脂, $\gamma$ -リノレン酸), 卵黄粉末, 大豆たん白, オリゴ糖, L-カルニチン, ミネラル類(Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), 乳化剤, ビタミン類(A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , D, E, K, ニコチン酸, パントテン酸, 葉酸, コリン), 香料, タウリン

## 2.2 試薬

検査法に既収載の各分析法に規定されている試薬を用いた。

なお、検査法に既収載の各分析法の該当する章、節及び番号を表2に示した。

表 2 愛玩動物用スナック製品等の検討対象とした各成分の検査法収載法

成分	検討対象とした検査法収載法	
ゼアラレノン	検査法第5章第1節7	液体クロマトグラフ質量分析計による単成分分析法
フモニシンB <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> 及びB <sub>3</sub>	検査法第5章第2節3	フモニシンの液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法
プロピレングリコール	検査法第7章6	ガスクロマトグラフ質量分析計による単成分分析法

## 2.3 装置及び器具

各分析法の検討に用いた装置及び器具を表3に示した。

表 3 検討に用いた装置及び器具

成分	装置及び機器
ゼアラレノン	1) 粉碎機: ZM-200 Retsch製 (1 mmスクリーン, 回転数14000 rpm) 2) 振とう機: レシプロシェーカーSR-2W (使用時振動数300 rpm) タイテック製 3) ガラス繊維ろ紙: GFP- 60 桐山製作所製 4) ブフナー漏斗: SU 97 桐山製作所製 5) ロータリーエバポレーター: R-200 BÜCHI製 6) 多機能カラム: MultiSep 226 AflaZON+カートリッジ Romer Labs製 7) 遠心分離器: Model 1-14 久保田製作所製 8) 高速遠心分離器: H-36 コクサン製 9) 液体クロマトグラフ質量分析計: 液体クロマトグラフ部: Prominence 島津製作所製 質量分析計部: LCMS-2010EV 島津製作所製 10) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計: 液体クロマトグラフ部: ACQUITY UPLC System Waters製 質量分析計部: Xevo TQD LC/MS/MS System Waters製
フモニシンB <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> 及びB <sub>3</sub>	1) 粉碎機: ZM-200 Retsch製 (1 mmスクリーン, 回転数14000 rpm) 2) 振とう機: レシプロシェーカーSR-2W (使用時振動数300 rpm) タイテック製 3) ガラス繊維ろ紙: GFP- 60 桐山製作所製 4) ブフナー漏斗: SU 97 桐山製作所製 5) pHメーター: D-52 堀場エステック製 6) ロータリーエバポレーター: R-200 BÜCHI製 7) 多機能カラム: MultiSep 211 Fumカートリッジ Romer Labs製 8) 吸引マニホールド: GL-SPE ジーエルサイエンス製 9) 遠心分離器: Model 1-14 久保田製作所製 10) 高速遠心分離器: H-36 コクサン製 11) 液体クロマトグラフ質量分析計: 液体クロマトグラフ部: Prominence 島津製作所製 質量分析計部: LCMS-2010EV 島津製作所製 12) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計: 液体クロマトグラフ部: ACQUITY UPLC System Waters製 質量分析計部: Xevo TQD LC/MS/MS System Waters製
プロピレングリコール	1) 粉碎機: ZM-200 Retsch製 (1 mmスクリーン, 回転数14000 rpm) 2) 振とう機: ストロングシェイカーSR-2DW タイテック製(使用時振動数280 rpm) 3) 超音波洗浄器: US-2 エスエヌディ製 4) グラファイトカーボントリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム多機能カラム(充てん剤量500 mg/500 mg/500 mg): Supelclean Envi-Carb II /SAX/PSA Sigma-Aldrich製 5) ガスクロマトグラフ質量分析計: ガスクロマトグラフ部: GC-2010 島津製作所製 質量分析計部: GCMS-QP2010 島津製作所製

## 2.4 定量方法

### 1) ゼアラレノン

検査法に既記載の液体クロマトグラフ質量分析計による単成分分析法（以下「ゼアラレノン収載法」という。）に準拠した。

ゼアラレノン収載法では、1回目の振とうはアセトニトリル-水 (21+4) 75 mL を、2回目の振とうはアセトニトリル-水 (21+4) 50 mL をそれぞれ加えて行い、200 mL の全量フラス

コに定容することとなっているが、分析試料が抽出溶媒を吸収して振とうができない場合には、抽出溶媒量等を以下のように変更した。

- i 分析試料が抽出溶媒を吸収して 1 回目の振とうができない場合はアセトニトリル-水 (21+4) 100 mL を、2 回目の振とうができない場合はアセトニトリル-水 (21+4) 80 mL を加えるよう変更した。
- ii 1 回目の振とうを 100 mL でも行えない場合は、アセトニトリル-水 (21+4) 120 mL を、2 回目の振とうはアセトニトリル-水 (21+4) 100 mL を加え、250 mL の全量フラスコに定容するように変更した。さらに MultiSep からの流出液 3 mL のうち 2 mL 採るところを 2.5 mL に変更した。

また、液体クロマトグラフ質量分析計（以下「LC-MS」という。）による測定において、ゼアラレノンの保持時間にピークが認められた場合には、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。）を用いて下記の測定条件で測定を行い、当該ピークがゼアラレノンであることを確認した。

#### 測定条件

（液体クロマトグラフ部）

カラム：ZORBAX Eclipse XDB-C18（内径 4.6 mm，長さ 150 mm，粒径 5  $\mu$ m） Agilent Technologies 製

溶離液：10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (9+1)（1 min 保持）→19 min→10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (1+4)（15 min 保持）

流速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム型質量分析計部）

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法

イオン源温度：150 °C

デソルベーションガス：N<sub>2</sub>（800L/h，400 °C）

キャピラリー電圧：0.6 kV

コーンガス：N<sub>2</sub>（50 L/h）

コーン電圧：表 4 のとおり

コリジョンガス：Ar（0.4 Pa）

コリジョンエネルギー：表 4 のとおり

モニターイオン：表 4 のとおり

表 4 確認方法における MS/MS 測定条件

かび毒名	測定モード	プリカーサーイオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイオン		コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
			定量用 ( <i>m/z</i> )	確認用 ( <i>m/z</i> )		
ゼアラレノン	—	317	175	—	52	24
			—	131	52	32

2) フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub>

検査法に既記載のフモニシンの液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法（以下「フモニシン収載法」という。）に準拠した。

フモニシン収載法では、1 回目の振とうはアセトニトリル-水（1+1）100 mL を、2 回目の振とうはアセトニトリル-水（1+1）50 mL をそれぞれ加えて行い、200 mL の全量フラスコに定容することとなっているが、分析試料が抽出溶媒を吸収し 2 回目の振とうができなかった場合には、アセトニトリル-水（1+1）80 mL を加えるよう変更した。

また、LC-MS による測定において、フモニシンの保持時間にピークが認められた場合には、LC-MS/MS を用いて下記の測定条件で測定を行い、当該ピークがフモニシンであることを確認した。

## 測定条件

（液体クロマトグラフ部）

カラム：ZORBAX Eclipse XDB-C18（内径 2.1 mm，長さ 150 mm，粒径 5 μm） Agilent Technologies 製

溶離液：0.1 v/v%ギ酸溶液-0.1 v/v%ギ酸アセトニトリル（3+1）→5 min →（1+1）（3 min 保持）→2 min→（3+1）

流速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム型質量分析計部）

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法

イオン源温度：150 °C

デソルベーションガス：N<sub>2</sub>（800 L/h，400 °C）

キャピラリー電圧：0.6 kV

コーンガス：N<sub>2</sub>（50 L/h）

コーン電圧：表 5 のとおり

コリジョンガス：Ar（0.4 Pa）

コリジョンエネルギー：表 5 のとおり

モニターイオン：表 5 のとおり

表 5 確認方法における MS/MS 測定条件

かび毒名	測定モード	プリカーサーイオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイオン		コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
			定量用 ( <i>m/z</i> )	確認用 ( <i>m/z</i> )		
フモニシンB <sub>1</sub>	+	722	334	—	40	40
			—	352	38	38
フモニシンB <sub>2</sub>	+	706	336	—	34	34
			—	354	32	32
フモニシンB <sub>3</sub>	+	706	336	—	34	34
			—	354	32	32

### 3) プロピレングリコール

検査法に既収載のガスクロマトグラフ質量分析計による単成分分析法（以下「プロピレングリコール収載法」という。）に準拠した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 妨害物質の検討

各成分に係る妨害物質の検討結果を以下の 1)~3)に示した。

#### 1) ゼアラレノン

表 1-1 に示した試料を含む 17 検体のスナック製品（成型ジャーキー（犬用）11 検体，成型ジャーキー（猫用）1 検体，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）3 検体，素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）1 検体及び菓子類（犬用）1 検体）を用い，ゼアラレノン収載法により調製した試料溶液を LC-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，検討したスナック製品 4 分類（成型ジャーキー，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類）のいずれの試料においてもゼアラレノンの定量を妨げるピークは認められなかった。なお，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）1 検体及び成型ジャーキー（犬用）8 検体において，検出限界以下のゼアラレノンのピークが認められた。検出したピークは，2.4 の 1)に示した LC-MS/MS を用いた測定結果からゼアラレノンと判断した。

一方，粉ミルクについては，ゼアラレノン収載法により調製した試料溶液を LC-MS に注入し測定した結果，著しい感度の低下がおき，その後に測定した試料溶液及び標準液の感度低下も認められたため，以降の検討は実施しなかった。

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図 1 に示した。

また，本分析法により調製した成型ジャーキー（犬用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用），素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）及び菓子類（犬用）のブランク試料溶液にゼアラレノンとして 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.25 µg/mL 相当量）をそれぞれ添加したマトリックス標準液について，本法に従って調製した同濃度のゼアラレノン標準液に対するピーク面積比を確認したところ，ピーク面積比はいずれも 106 %であり，ゼアラレノンは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

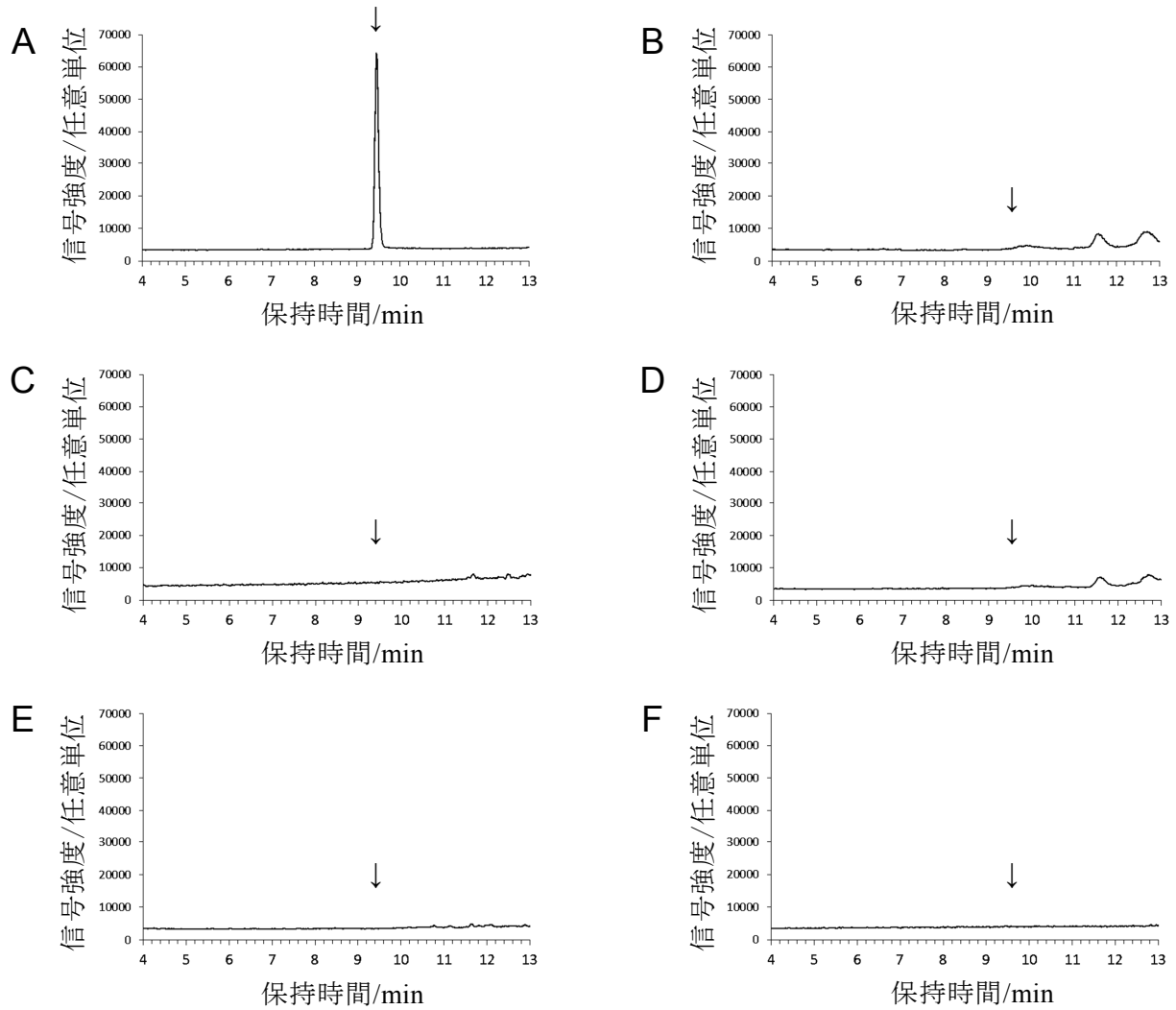


図1 ゼアラレノン収載法の妨害物質の検討時に得られた選択イオン検出クロマトグラムの例

(↓: ゼアラレノンの保持時間を示す. スケールは全図共通. )

- A: 標準液 (0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : ゼアラレノンとして 0.5 ng )
- B: 成型ジャーキー (犬用)
- C: 成型ジャーキー (猫用)
- D: 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用)
- E: 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用)
- F: 菓子類 (犬用ビスケット)



2) フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub>

表 1-2 に示した試料を含む 17 検体のスナック製品（成型ジャーキー（犬用）11 検体，成型ジャーキー（猫用）1 検体，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）3 検体，素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）1 検体及び菓子類（犬用ビスケット）1 検体）を用い，フモニシン収載法により調製した試料溶液を LC-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，検討したスナック製品 4 分類（成型ジャーキー，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類）のいずれの試料においてもフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> の定量を妨げるピークは認められなかった．なお，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）1 検体及び成型ジャーキー（犬用）9 種類において，検出限界以下のフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 又は B<sub>3</sub> のピークが認められた．検出したピークは，2.4 の 2) に示した LC-MS/MS を用いた測定結果からフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 又は B<sub>3</sub> と判断した．

一方，粉ミルクについては，ガラス繊維ろ紙でろ過が行えず，フモニシン収載法による試料溶液の調製が行えなかったため，適用は不可と考えられた．

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図 2 に示した．

また，本分析法により調製した成型ジャーキー（犬用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用），素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）及び菓子類（犬用ビスケット）のブランク試料溶液に各フモニシンとして 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.3 µg/mL 相当量）をそれぞれ添加したマトリックス標準液について，本法に従って調製した同濃度の各フモニシン標準液に対するピーク面積比を確認したところ，ピーク面積比は 101~108 %であり，各フモニシンは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった．

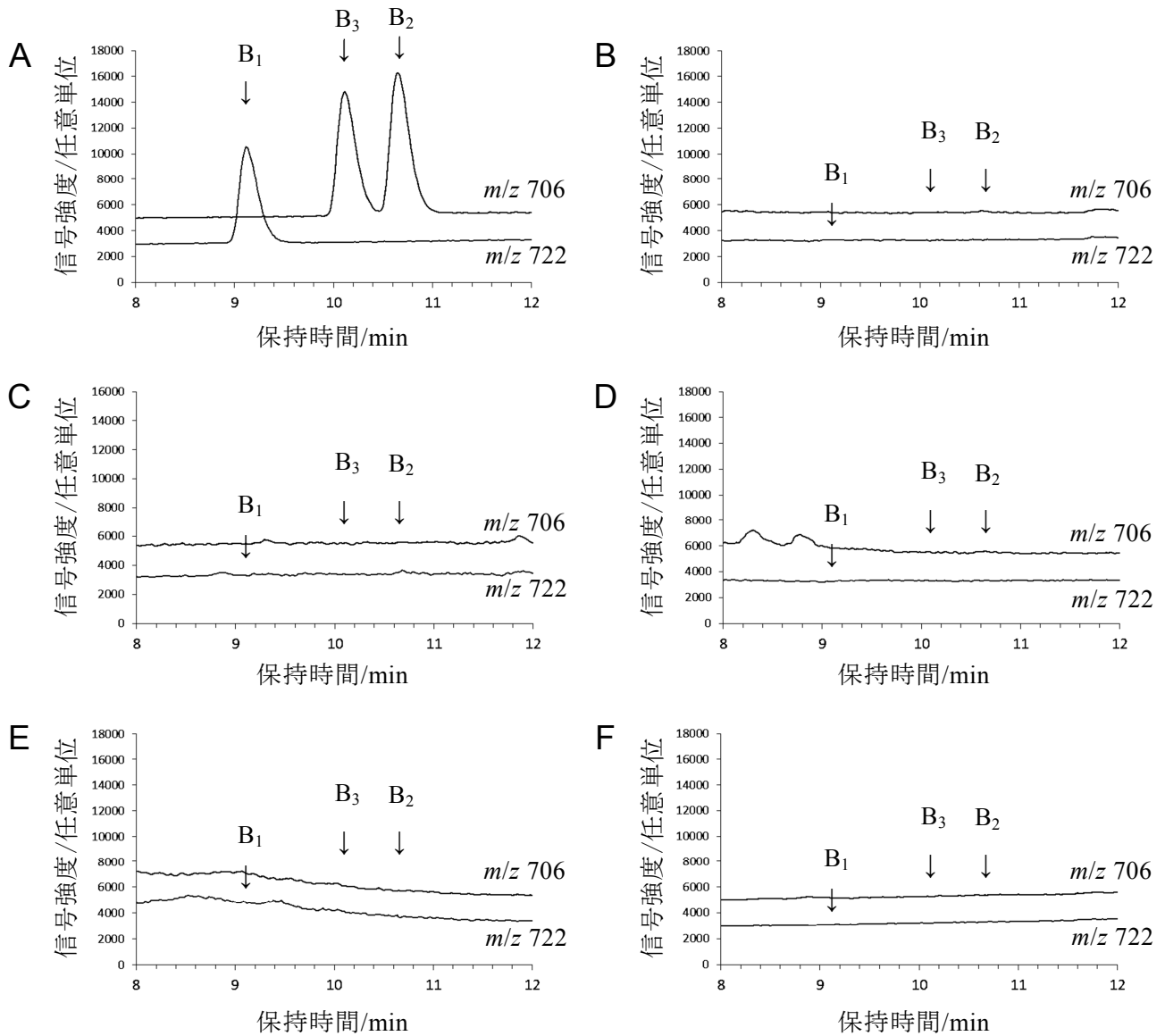


図2 フモニシン収載法の妨害物質の検討時に得られた選択イオン検出クロマトグラムの例

(↓B<sub>1</sub>, ↓B<sub>2</sub>及び↓B<sub>3</sub>は、それぞれフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>及び B<sub>3</sub>の保持時間を示す。

スケールは全図共通. ベースラインはシフトさせている.)

- A: 標準液 (0.05 μg/ mL : フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>及び B<sub>3</sub>として各 0.25 ng)
- B: 成型ジャーキー (犬用)
- C: 成型ジャーキー (猫用)
- D: 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用)
- E: 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用)
- F: 菓子類 (犬用ビスケット)

### 3) プロピレングリコール

表 1-3 に示した試料を含む 22 検体のスナック製品（成型ジャーキー（犬用）11 検体，成型ジャーキー（猫用）4 検体，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）3 検体及び素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）4 検体）を用い，プロピレングリコール収載法により調製した試料溶液をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し，定量を妨げるピークの有無を確認した．その結果，検討したスナック製品 3 分類（成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ））のいずれの試料においてもプロピレングリコールの定量を妨げるピークは認められなかった．なお，成型ジャーキー（犬用）4 検体，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）1 検体及び素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）2 検体から定量限界（下限）以上のプロピレングリコールのピークが検出され，成型ジャーキー（猫用）1 検体から検出限界以上定量限界（下限）未満のプロピレングリコールのピークが検出された．検出したピークは，2 つの確認イオンの強度比からプロピレングリコールと判断した．

一方，菓子類及び粉ミルクについては，水膨潤させた試料が高い粘性を持ち，遠心沈殿管の壁面に貼り付いてヘキサンの混合が行えなかったため，本法は適用できなかった．

本検討で得られたクロマトグラムの一例を図 3 に示した．

また，本分析法により調製した成型ジャーキー（犬用），成型ジャーキー（猫用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用）及び素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）のブランク試料溶液にプロピレングリコールとして 500 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 50 µg/mL 相当量）をそれぞれ添加したマトリックス標準液について，本法に従って調製した同濃度のプロピレングリコール標準液に対するピーク面積比を確認したところ，ピーク面積比は 101~112 %であり，プロピレングリコールは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった．

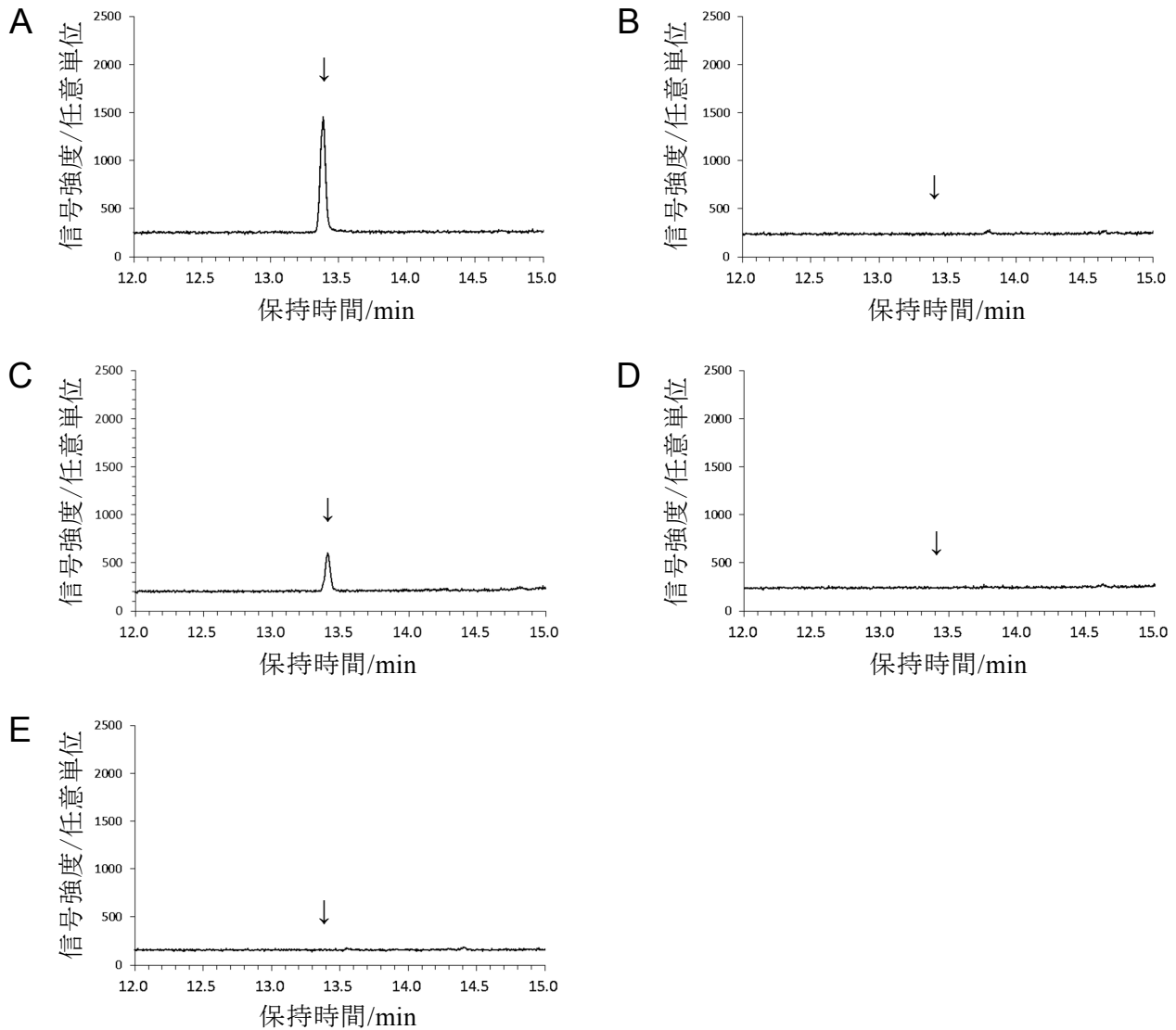


図3 プロピレングリコール収載法の妨害物質の検討時に得られた  
選択イオン検出クロマトグラムの例

(↓: プロピレングリコールの保持時間を示す. スケールは全図共通.)

- A: 標準液 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : プロピレングリコールとして 5 ng)
- B: 成型ジャーキー (犬用)
- C: 成型ジャーキー (猫用)
- D: 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用)
- E: 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用)

### 3.2 添加回収試験

各成分に係る添加回収試験の結果を以下の 1)~3)に示した.

#### 1) ゼアラレノン

表 1-1 に示した成型ジャーキー (犬用), 成型ジャーキー (猫用), 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用), 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用) 及び菓子類 (犬用ビスケット) にゼアラレノンとして各 1 及び 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 0.25 及び

0.05  $\mu\text{g/mL}$  相当量) を添加した試料を用い、ゼアラレノン収載法により 5 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は表 6-1 のとおり、ゼアラレノンの平均回収率は 86.8~110 %，その繰返し精度は  $\text{RSD}_r$  として 17 %以下であった。

得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を図 4 に示した。

表 6-1 ゼアラレノンの添加回収試験結果

添加濃度 (mg/kg)	試料	繰返し数	添加回収率 (%)	繰返し精度 $\text{RSD}_r$ (%)
1.0	成型ジャーキー(犬用)	5	102	4.3
	成型ジャーキー(猫用)	5	93.7	4.4
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	95.1	6.1
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	105	6.2
	菓子類(犬用ビスケット)	5	101	6.4
0.2	成型ジャーキー(犬用)	5	95.8	8.4
	成型ジャーキー(猫用)	5	101	4.1
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	110	2.2
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	97.7	4.4
	菓子類(犬用ビスケット)	5	86.8	17

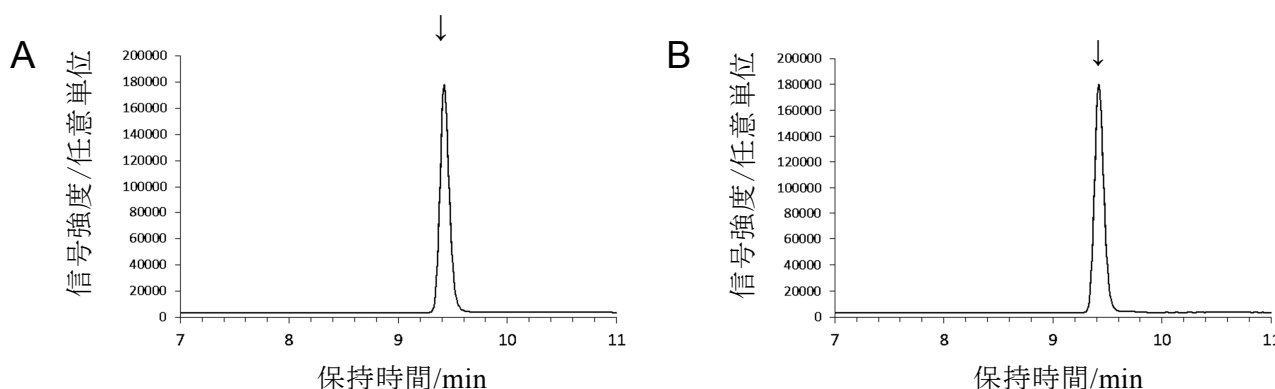


図 4 ゼアラレノンの添加回収試験で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例

(↓: ゼアラレノンのピークを示す. スケール両図共通. )

A: 標準液 (0.25  $\mu\text{g/mL}$ : ゼアラレノンとして 2.5 ng)

B: 成型ジャーキー (犬用) (試料中 1 mg/kg 相当量添加: 最終試料溶液中で 0.25  $\mu\text{g/mL}$  相当量)

## 2) フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub>

表 1-2 に示した成型ジャーキー (犬用), 成型ジャーキー (猫用), 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用), 素材乾燥ジャーキー (猫用) 及び菓子類 (犬用ビスケット) にフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> としてそれぞれ 1 及び 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 0.3 及び 0.06  $\mu\text{g/mL}$  相当量) 添加した試料を用い、フモニシン収載法により 5 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は表 6-2 のとおりであり、平均回収率 37.2~103 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 23 %以下であった。低回収率の傾向が認められ、フモニシン収載法のスナック製品への適用は難しく、スナック製品に適用する別の定量方法の検討が必要と考えられた。

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図 5 に示した。

表 6-2 フモニシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> の添加回収試験結果

添加成分名	添加濃度 (mg/kg)	試料	繰返し数	添加回収率 (%)	繰返し精度 $RSD_r$ (%)
フモニシン B <sub>1</sub>	1.0	成型ジャーキー(犬用)	5	50.9	19
		成型ジャーキー(猫用)	5	84.5	11
		素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	43.6	13
		素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	84.9	6.2
		菓子類(犬用ビスケット)	5	66.5	9.5
	0.2	成型ジャーキー(犬用)	5	82.6	4.0
		成型ジャーキー(猫用)	5	77.7	2.4
		素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	52.1	6.4
		素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	103	13
		菓子類(犬用ビスケット)	5	72.1	21
フモニシン B <sub>2</sub>	1.0	成型ジャーキー(犬用)	5	49.9	14
		成型ジャーキー(猫用)	5	82.2	11
		素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	37.2	11
		素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	63.2	5.4
		菓子類(犬用ビスケット)	5	65.3	7.9
	0.2	成型ジャーキー(犬用)	5	75.8	2.6
		成型ジャーキー(猫用)	5	74.7	2.9
		素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	48.4	6.7
		素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	63.0	5.8
		菓子類(犬用ビスケット)	5	70.4	23
フモニシン B <sub>3</sub>	1.0	成型ジャーキー(犬用)	5	51.6	15
		成型ジャーキー(猫用)	5	89.7	11
		素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	40.1	12
		素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	67.7	5.3
		菓子類(犬用ビスケット)	5	66.3	8.2
	0.2	成型ジャーキー(犬用)	5	70.0	3.2
		成型ジャーキー(猫用)	5	76.3	2.8
		素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	45.2	9.3
		素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	77.2	9.1
		菓子類(犬用ビスケット)	5	71.0	21

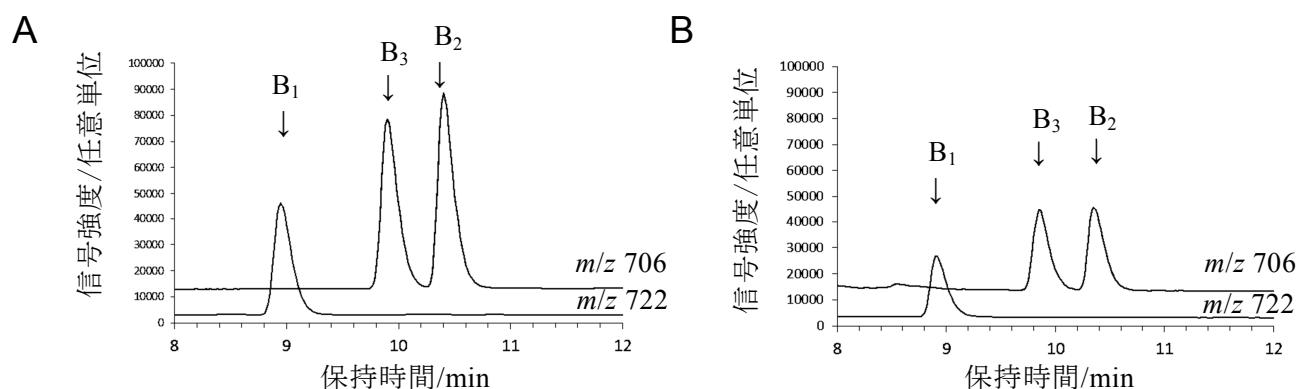


図5 フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> 添加回収試験で得られた選択イオン検出クロマトグラムの場合  
 (↓B<sub>1</sub>, ↓B<sub>2</sub> 及び ↓B<sub>3</sub> は、それぞれフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> の保持時間を示す。  
 スケールは両図共通。ベースラインはシフトさせている。)

A: 標準液 (0.3 µg/mL : フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> として各 1.5 ng)

B: 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用) (1 mg/kg 相当量添加 : 最終試料溶液中で 0.3 µg/mL 相当量)

### 3) プロピレングリコール

表 1-3 に示した成型ジャーキー (犬用), 成型ジャーキー (猫用), 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用) 及び素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用) にプロピレングリコールとして 5000 及び 500 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 50 及び 5 µg/mL 相当量) 添加した試料を用いて, プロピレングリコール収載法により 5 点併行で定量し, 回収率及び繰返し精度を検討した。その結果は表 6-3 に示したとおり, プロピレングリコールの平均回収率は 98.4~104 %, 繰返し精度は RSD<sub>r</sub> として 2.9 % 以下であった。

得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を図 6 に示した。

表 6-3 プロピレングリコールの添加回収試験結果

添加濃度 (mg/kg)	試料	繰返し数	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)
5000	成型ジャーキー(犬用)	5	98.4	2.0
	成型ジャーキー(猫用)	5	100	1.2
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	103	2.9
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	99.3	1.7
500	成型ジャーキー(犬用)	5	102	1.5
	成型ジャーキー(猫用)	5	97.0	2.3
	素材乾燥ジャーキー(ハードタイプ)(犬用)	5	102	2.2
	素材乾燥ジャーキー(ソフトタイプ)(犬用)	5	104	2.6

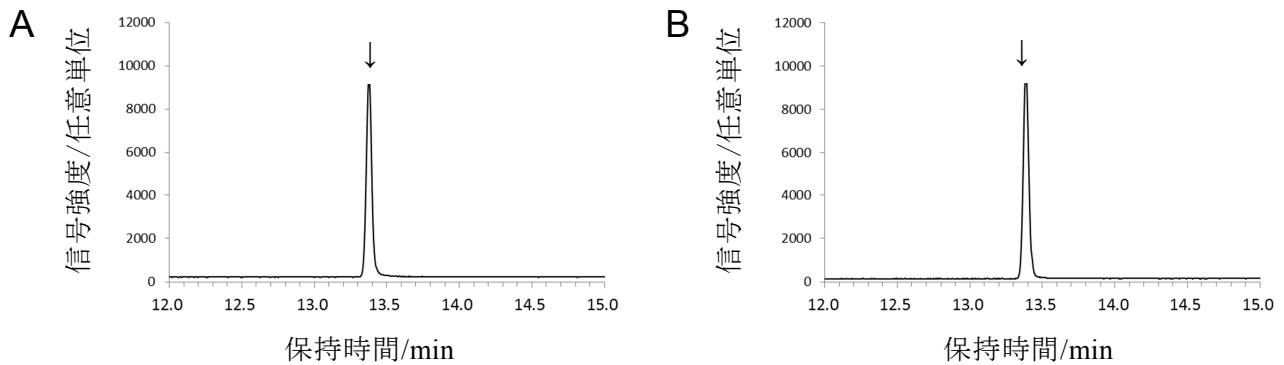


図6 プロピレングリコール添加回収試験で得られた選択イオン検出クロマトグラムの例

(↓: プロピレングリコールのピークを示す. スケールは両図共通.)

A: 標準液 (50 µg/mL: プロピレングリコールとして 50 ng)

B: 成型ジャーキー (猫用) (5000 mg/kg 相当量添加: 最終試料溶液中で 50 µg/mL 相当量)

### 3.3 定量限界 (下限) 及び検出限界の検討

各分析法の定量限界 (下限) 及び検出限界については, 今回の添加回収試験における平均回収率及び繰返し精度の標準偏差並びに検査法第 11 章 3 (4) から総合的に判断することとした.

その結果, 表 7 のとおり, ゼアラレノン収載法のスナック製品 4 分類 (成型ジャーキー, 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ) 及び菓子類) における定量限界 (下限) 及び検出限界は, ドライ製品, セミドライ製品及びウェット製品における定量限界 (下限) 及び検出限界を変更することなく適用できると考えられた. 同様に, プロピレングリコール収載法のスナック製品 3 分類 (成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ)) における定量限界 (下限) 及び検出限界は, ドライ製品及びセミドライ製品における定量限界 (下限) 及び検出限界を変更することなく適用できると考えられた.

表 7 スナック製品における各成分の定量限界 (下限) 及び検出限界

成分	定量限界 (下限)	検出限界
ゼアラレノン	0.2 mg/ kg	0.1 mg/ kg
プロピレングリコール	500 mg/ kg	200 mg/ kg

## 4 まとめ

かび毒 (ゼアラレノン並びにフモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub>) 及び添加物 (プロピレングリコール) の検査法収載法のスナック製品 5 分類への適用性の確認について検討した結果, 表 8 のとおり, 適用範囲の追加が可能であった. なお, ゼアラレノンについては, ゼアラレノン収載法の一部変更を要した.

フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> については, スナック製品 5 分類に適用する別の定量方法の検討が必要と考えられた.

また, ゼアラレノン収載法は粉ミルクに対して, プロピレングリコール収載法は菓子類及び粉ミルクに対して, それぞれ試料溶液測定時の感度低下及び脱脂操作が行えないため適用不可であった.



表 8 検討した各分析法の追加適用範囲

成分	分析法	追加可能な適用範囲
ゼアラレノン	検査法第2章第1節7を一部変更	成型ジャーキー，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類
プロピレングリコール	検査法第7章6のとおり	成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）

## 文 献

- 1) 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).
- 2) U.S. Food and Drug Administration: FDA releases progress on jerky pet treat investigation, <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm371450.htm>, cited 15 Apr. 2016.
- 3) 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).

精度管理
------

# 1 平成 27 年度飼料等の共通試料による分析鑑定について

## Proficiency Test (in the Fiscal Year 2015)

鈴木 知華<sup>\*1</sup>, 義本 将之<sup>\*2</sup>, 風間 鈴子<sup>\*3</sup>,  
森口 里美<sup>\*4</sup>, 船木 紀夫<sup>\*5</sup>, 石塚 優香<sup>\*6</sup>

### 1 目 的

飼料検査指導機関、飼料・飼料添加物製造等業者、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うことにより、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	鑑定用飼料原料混合試料
D 試料	ほ乳期子豚育成用プレミックス

### 3 共通試料の調製

#### 3.1 調製年月日

平成 27 年 6 月 25 日及び 6 月 26 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

粉砕した後、1 mm のふるい目を通させた中すう育成用配合飼料 80 kg を用い、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 等分した。その中の 4 区画を一つに合わせてよく混合した後、4 等分して元に戻した。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（約 20 g）ずつとり、1 袋当たり約 180 g 入りの試料 380 個を調製した。

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

<sup>\*2</sup> 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

<sup>\*3</sup> 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、現 肥飼料安全検査部

<sup>\*4</sup> 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、現 神戸センター

<sup>\*5</sup> 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

<sup>\*6</sup> 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

1 mm のふるい目を通過させた魚粉 80 kg を用い、A 試料と同様に試料 380 個を調製した。

## 3) C 試料

各原料中の夾雑物を除去した後、必要に応じて粉碎し、表 2 に示した 10 種類の原料（総量 80 kg）を同表の混合割合で混ぜ合わせた試料を用い、A 試料と同様に試料 380 個を調製した。

表 2 C 試料の原料及びその混合割合

原料名	混合割合 (%)	原料名	混合割合 (%)
とうもろこし	34	やし油かす	10
大麦	18	なたね油かす	7
玄米	3	魚粉	3
コーングルテンミール	10	リン酸カルシウム	3
大豆油かす	10	食塩	2

## 4) D 試料

ほ乳期子豚育成用プレミックス 80 kg を用い、A 試料と同様に試料 380 個を調製した。

## 4 分析鑑定項目及び実施要領

## 4.1 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・・・飼料原料の検出及びその混合割合の推定

D 試料・・・銅、亜鉛及びクエン酸モランテル

## 4.2 実施要領

「平成 27 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」（189 ページ）による。

## 5 共通試料の均質性確認

A 及び B 試料では粗たん白質及び粗灰分、D 試料では銅及び亜鉛の分析によって、Thompson らの harmonized protocol<sup>1)</sup>に基づき、各試料の均質性を確認した。

ランダムに抜き取った 10 袋で各 2 点併行分析した結果を表 3 に、また、その結果に基づく一元配置の分散分析結果を表 4 に示した。

いずれの試料においても、分散比  $F_0$  は  $F$  境界値を下回り、有意水準 5 %において試料間に有意な差は認められず、試料の均質性に問題はないと判断した。

表 3 A, B 及び D 試料の分析結果

試料 No.	A試料				B試料				D試料			
	粗たん白質 (%)		粗灰分 (%)		粗たん白質 (%)		粗灰分 (%)		銅 (g/kg)		亜鉛 (g/kg)	
	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2
1	18.08	17.94	6.11	6.19	65.74	65.99	16.55	16.54	40.43	40.55	40.88	40.61
2	17.60	18.15	6.19	6.13	65.76	65.64	16.69	16.46	40.87	41.24	41.01	41.47
3	17.91	18.31	6.14	6.11	65.73	65.91	16.54	16.58	38.62	40.37	38.40	40.27
4	18.21	18.00	6.09	6.15	65.61	65.70	16.37	16.49	40.37	39.93	40.03	39.69
5	18.13	18.43	6.11	6.16	65.40	65.83	16.51	16.39	41.05	39.56	41.32	39.34
6	18.26	18.47	6.13	6.13	65.90	65.60	16.51	16.47	39.62	40.68	39.72	40.72
7	18.14	18.03	6.11	6.12	65.39	66.21	16.53	16.50	40.43	40.12	40.43	40.07
8	18.14	18.04	6.20	6.09	64.71	65.58	16.47	16.38	39.75	40.49	39.91	40.32
9	18.44	18.15	6.19	6.10	65.52	66.09	16.42	16.61	39.68	40.43	40.07	39.78
10	18.43	18.04	6.13	6.17	65.94	65.81	16.46	16.61	40.55	41.05	40.29	40.45

表 4 A, B 及び D 試料の分散分析結果

成分名	要因	偏差平方和	自由度	不偏分散	分散比	F境界値
		$S$	$\varphi$	$V=S/\varphi$	$F_0=V_A/V_E$	$F(\alpha=0.05)$
A試料	試料間 A	0.3938	9	0.0438	0.95	3.02
	粗たん白質					
	分析誤差 E	0.4599	10	0.0460		
	総計 T	0.8537	19			
	粗灰分					
	A	0.0039	9	0.0004	0.22	3.02
B試料	粗たん白質					
	A	0.8276	9	0.0920	0.85	3.02
	E	1.0765	10	0.1076		
	T	1.9041	19			
	粗灰分					
	A	0.0518	9	0.0058	0.75	3.02
D試料	銅					
	E	4.1037	10	0.4104		
	T	7.3859	19			
	亜鉛					
	A	4.7176	9	0.5242	1.14	3.02
	E	4.6124	10	0.4612		
T	9.3300	19				

## 6 参加試験室

- 6.1 総数 240  
 うち 飼料検査指導機関…46  
 飼料製造業者関係…155  
 飼料添加物製造業者関係…15  
 民間分析機関等…24
- 6.2 試料別参加試験室数  
 A 試料…237  
 B 試料…234  
 C 試料…127  
 D 試料…93

## 7 分析成績及び解析結果並びに鑑定成績

### 7.1 分析成績及び解析結果

A, B 及び D 試料について, その分析成績を表 5 に, ヒストグラムを図 1 に, また, 解析結果を表 6~8 に示した.

分析値の解析は, ロバスト法に基づき以下の手順により行った.

式 1 により頑健な標準偏差の推定量として NIQR (Normalised inter quartile range; 標準四分位範囲) を求めた後, 式 2 により各分析値の  $z$ -スコアを求めた. なお, 各四分位数は, 表計算ソフトウェア Microsoft Excel の関数 QUARTILE.INC を用いて求めた.

$$\text{NIQR} = \frac{(c-a)}{1.349} \dots\dots\dots \text{式 1}$$

$a$ : 第 1 四分位数

$c$ : 第 3 四分位数

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

$x$ : 各試験室の分析値

$b$ : 中央値

また,  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上の分析値を異常値と判断し, これを棄却した後, 平均値の 95%信頼区間を求めた.

### 7.2 鑑定成績

C 試料について, その鑑定成績を表 9 及び 10 に示した.

表5 A, B 及び D 試料

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(管理分析法)		SL(飼料分析基準)	
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score
1	11.20	1 -3.45	18.35	2 0.20	4.14	1 -0.87	2.68	1 -2.83	6.20	1 0.47	1.054	2 -0.90	0.887	1 0.14				
2	11.96	1 -0.71	19.03	4 2.98	4.25	2 0.00			5.66	1 -3.80			0.859	1 -1.44				
3	11.99	1 -0.61	18.12	1 -0.73	4.29	1 0.31			5.89	1 -1.98								
4			18.27	4 -0.12	3.88	2 -2.93												
5	12.15	1 -0.03	18.58	4 1.14	4.54	1 2.30			6.05	1 -0.71								
6	12.13	1 -0.10	18.53	4 0.94	4.52	1 2.14			6.09	1 -0.39								
9	12.18	1 0.07	18.19	4 -0.44	4.28	1 0.23	3.99	2 1.69	6.18	1 0.31	1.098	2 -0.03	0.899	1 0.82				
10	12.26	1 0.35	18.09	4 -0.85	4.43	1 1.42	4.65	3 3.97	6.18	1 0.31	1.070	2 -0.58	0.882	1 -0.14				
11	12.19	1 0.10	18.20	4 -0.40	4.22	2 -0.23	3.51	3 0.03	6.13	1 -0.07	1.104	3 0.07	0.843	1 -2.35				
12	12.07	1 -0.32	18.38	3 0.32	4.10	1 -1.19	3.21	2 -1.00	6.19	1 0.39	1.030	2 -1.37	0.894	1 0.53				
13	11.89	1 -0.97	18.37	3 0.28	4.21	2 -0.31			6.33	1 1.50	1.123	2 0.45	0.899	1 0.82			56.8	3 1.73
14	12.14	1 -0.07	18.17	4 -0.53	4.37	1 0.95	3.71	2 0.72	6.23	1 0.71	1.120	2 0.39	0.890	1 0.31				
17	12.12	1 -0.14	17.94	4 -1.47	4.19	2 -0.47	4.34	2 2.90	6.16	1 0.15	1.110	2 0.19	0.883	1 -0.08				
18	12.46	1 1.07	18.29	2 -0.04					6.15	1 0.07	1.094	2 -0.11	0.870	1 -0.82				
18			18.42	3 0.49														
19	12.09	1 -0.25	18.13	3 -0.69	4.33	1 0.63	4.16	2 2.28	6.01	1 -1.03	1.142	2 0.82	0.902	1 0.99			50.3	3 -0.88
20	12.14	1 -0.07	18.58	3 1.14	4.04	2 -1.66			6.18	1 0.31								
21	12.00	1 -0.57	18.43	3 0.53	4.36	1 0.87	3.48	2 -0.06	6.12	1 -0.15	1.107	2 0.13	0.874	1 -0.59				
22	12.20	1 0.14	18.25	4 -0.20	4.16	2 -0.71	3.47	2 -0.10	6.22	1 0.63	1.206	1 2.07	0.868	1 -0.93			54.2	3 0.68
23	12.33	1 0.61	18.09	3 -0.85	4.30	1 0.39	3.47	2 -0.10	6.02	1 -0.95	1.100	2 0.00	0.863	1 -1.22	60.9	1 2.15		
24	12.36	1 0.71	18.55	3 1.02	4.32	2 0.55			6.07	1 -0.55	1.096	2 -0.07	0.880	1 -0.25	48.7	2 -1.01		
25	12.24	1 0.28	18.29	1 -0.04	4.26	1 0.07	3.31	2 -0.65	6.27	1 1.03	1.056	2 -0.86	0.893	1 0.48			53.4	3 0.36
31	11.77	1 -1.40	17.82	4 -1.96	4.34	1 0.71			5.90	1 -1.90								
32	12.01	1 -0.53	18.05	4 -1.02	4.22	2 -0.23	3.88	3 1.31	6.14	1 0.00	1.121	2 0.41	0.900	1 0.88			52.0	3 -0.20
33	12.25	1 0.32	18.37	3 0.28	4.19	1 -0.47	3.52	2 0.06	6.19	1 0.39	1.040	2 -1.17	0.836	1 -2.75	49.6	1 -0.77		
34	11.95	1 -0.75	19.74	4 5.88	4.70	2 3.52	3.89	3 1.34	6.78	1 5.02								
35	12.04	1 -0.43	18.30	4 0.00	4.18	2 -0.55			6.03	1 -0.87					49.7	1 -0.75		
36	11.55	1 -2.19	18.68	1 1.55	4.64	1 3.09	3.58	1 0.27	5.89	1 -1.98	1.093	3 -0.13	0.862	2 -1.27				
37	11.87	1 -1.04	17.98	4 -1.30	4.13	1 -0.95	4.70	3 4.15	6.33	1 1.50	1.064	2 -0.70	0.872	1 -0.71				
38			18.47	3 0.69	4.26	2 0.07												
40	11.69	1 -1.69	18.46	3 0.65	4.07	2 -1.42	3.56	3 0.20	6.18	1 0.31	1.273	1 3.39	0.916	1 1.78			54.8	3 0.92
41			18.81	2 2.08														
42	12.28	1 0.43	18.45	2 0.61	4.32	1 0.55	3.77	2 0.93	5.97	1 -1.34	1.085	2 -0.29	0.853	1 -1.78				
43	11.99	1 -0.61	18.43	4 0.53	4.26	2 0.07			6.07	1 -0.55								
44	11.75	1 -1.47	18.31	4 0.04	4.41	2 1.26	3.55	3 0.17	6.17	1 0.23	1.118	2 0.35	0.887	1 0.14				
45	11.77	1 -1.40	18.36	2 0.24	4.29	1 0.31	3.53	3 0.10	6.16	1 0.15	1.098	2 -0.03	0.890	1 0.31				
46	12.19	1 0.10	17.42	1 -3.59	4.26	1 0.07	2.55	2 -3.28	6.11	1 -0.23	1.149	2 0.96	0.900	1 0.88				
47	12.21	1 0.17	18.59	4 1.18	4.28	1 0.23			6.25	1 0.87								
48	12.01	1 -0.53	18.62	1 1.30	4.10	2 -1.19	3.57	3 0.24	6.11	1 -0.23	1.120	2 0.39	0.875	1 -0.53			50.9	3 -0.64
50	12.15	1 -0.03	18.13	2 -0.69	4.20	1 -0.39	4.21	2 2.45	5.97	1 -1.34								
51	12.14	1 -0.07	18.25	3 -0.20	4.42	1 1.34			6.09	1 -0.39	1.050	2 -0.98	0.894	1 0.53			53.3	3 0.32
52	11.74	1 -1.51	18.64	4 1.38	4.18	2 -0.55	3.89	3 1.34	6.22	1 0.63	1.114	2 0.27	0.883	1 -0.08			52.5	3 0.00
54	11.77	1 -1.40	18.57	4 1.10	4.58	1 2.61			5.94	1 -1.58								
55	10.41	2 -6.29																
56	11.34	1 -2.94	18.58	4 1.14	4.26	1 0.07			6.16	1 0.15								
57	12.00	1 -0.57	18.75	3 1.83					6.14	1 0.00	1.135	2 0.68	0.909	1 1.39				
58	12.38	1 0.79	18.26	3 -0.16	4.30	1 0.39			6.07	1 -0.55								
59	11.98	1 -0.64	18.57	2 1.10					6.22	1 0.63								
60	11.84	2 -1.15	16.78	3 -6.21					5.87	2 -2.14								
61			20.53	2 9.11														
62	11.78	1 -1.36	18.28	4 -0.08	4.21	2 -0.31	3.44	3 -0.20	6.01	1 -1.03	1.119	3 0.37	0.885	1 0.02	48.6	1 -1.03		
64	11.81	1 -1.25	17.96	4 -1.38	4.26	2 0.07	4.26	3 2.62	6.15	1 0.07	1.088	2 -0.23	0.904	1 1.10			51.9	3 -0.24
65	11.76	1 -1.43	18.18	3 -0.49	4.31	2 0.47			6.28	1 1.11	1.107	2 0.13	0.883	1 -0.08	52.2	1 -0.10		
66	12.12	1 -0.14	18.20	3 -0.40	4.42	1 1.34	3.38	2 -0.41	6.15	1 0.07	1.069	2 -0.60	0.893	1 0.48			51.7	3 -0.32
67	11.96	1 -0.71	18.13	2 -0.69	3.39	1 -6.82			5.91	1 -1.82	1.077	2 -0.45	0.884	1 -0.02				
68	12.33	1 0.61	18.27	3 -0.12	4.42	1 1.34	3.60	3 0.34	6.14	1 0.00	1.050	1 -0.98	0.830	1 -3.09	52.3	1 -0.08		
68			17.98	4 -1.30														
69	11.87	1 -1.04													52.9	1 0.07		
70	12.40	1 0.86	18.53	1 0.94	4.29	1 0.31	3.34	1 -0.55	6.14	1 0.00	1.109	1 0.17	0.895	1 0.59				
70			18.53	3 0.94			3.08	2 -1.45										
70			18.41	4 0.44														
71	12.19	1 0.10	18.44	3 0.57	4.33	1 0.63	3.56	4 0.20	6.09	1 -0.39	1.064	2 -0.70	0.889	1 0.25				
72	11.96	1 -0.71							6.33	1 1.50	1.103	2 0.05	0.901	1 0.93			50.4	4 -0.84
74	12.17	1 0.03	18.23	2 -0.28	4.32	1 0.55	3.42	2 -0.27	6.06	1 -0.63	1.133	2 0.64	0.881	1 -0.19				
75	12.24	1 0.28	18.47	1 0.69	4.26	1 0.07	3.57	2 0.24	5.78	1 -2.85	1.042	2 -1.13	0.879	1 -0.31				
76	11.73	1 -1.54	18.29	3 -0.04	4.29	2 0.31			6.25	1 0.87	1.226	1 2.47	0.903	1 1.05				
77			18.46	3 0.65														
78	12.50	1 1.22	18.32	4 0.08	4.27	1 0.15	3.15	2 -1.21	6.13	1 -0.07	0.717	2 -7.51	0.891	1 0.36				
79	12.42	1 0.93	13.93	1 -17.86	4.72	1 3.22	2.98	1 -1.79	6.13	1 -0.07			0.878	1 -0.36				
80	12.26	1 0.35	18.22	3 -0.32	4.15	1 -0.79	3.99	1 1.69	5.91	1 -1.82	1.154	3 1.05	0.905	1 1.16				
81	11.35	1 -2.91													56.9	1 1.11		
82	12.53	1 1.33	17.40	1 -3.67	4.22	1 -0.23	2.97	2 -1.83	6.07	1 -0.55			0.663	1 -12.58				
83	12.21	1 0.17	18.29	3 -0.04	4.15	1 -0.79	3.38	2 -0.41	6.09	1 -0.39	1.152	1 1.02	0.856	1 -1.61				
84	12.20	1 0.14	18.33	3 0.12	4.23	1 -0.15	3.58	3 0.27	5.97	1 -1.34	1.034	2 -1.29	0.859	1 -1.44			55.0	3 1.01
86	12.01	1 -0.53	18.73	3 1.75	4.21	2 -0.31	3.61	2 0.38	5.99	1 -1.19	1.095	2 -0.09	0.867	1 -0.99			52.3	3 -0.08

の分析成績 (1)

B試料				D試料								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	
9.77	1 -3.41	64.60	2 -0.96	16.46	1 -0.86	1.25	2 -0.96									1
10.05	1 -2.12	68.10	4 4.00	16.63	1 0.77											2
10.65	1 0.64	64.64	1 -0.90	16.59	1 0.38											3
9.33	1 -5.44	64.59	4 -0.97													4
10.53	1 0.09	65.25	4 -0.04	16.45	1 -0.96											5
10.60	1 0.41	65.00	4 -0.39	16.48	1 -0.67											6
10.54	1 0.13	65.17	4 -0.15	16.59	1 0.38					40.23	1 0.09	39.71	1 0.72			9
10.55	1 0.18	65.46	4 0.25	16.59	1 0.38											10
10.47	1 -0.18	65.04	4 -0.34	16.69	1 1.34											11
10.45	1 -0.27	65.81	3 0.75	16.66	1 1.05											12
10.31	1 -0.92	65.54	3 0.36	16.59	1 0.38											13
10.44	1 -0.32	65.07	4 -0.29	16.56	1 0.09					40.43	1 0.33	37.80	1 -0.33			14
10.54	1 0.13	64.12	4 -1.64	16.48	1 -0.67											17
10.65	1 0.64	65.39	2 0.15	16.51	1 -0.38					39.92	1 -0.27	40.33	1 1.07			18
		66.13	3 1.20													18
10.45	1 -0.27	65.23	3 -0.07	16.51	1 -0.38					40.52	1 0.44	39.92	1 0.84			19
10.40	1 -0.50	67.00	3 2.44	16.64	1 0.86											20
10.50	1 -0.04	66.09	3 1.15	16.70	1 1.44											21
10.41	1 -0.46	65.40	4 0.17	16.61	1 0.57											22
10.49	1 -0.09	65.34	3 0.08	16.78	1 2.21											23
10.59	1 0.36	66.13	3 1.20	16.55	1 0.00											24
10.56	1 0.23	64.51	1 -1.09	16.49	1 -0.57	1.35	2 0.96	230.7	1 0.38	40.84	1 0.83	39.54	1 0.63	10.4	1 0.98	25
11.34	1 3.82	64.89	4 -0.55	16.39	1 -1.54											31
10.20	1 -1.42	64.73	4 -0.78	16.61	1 0.57									9.6	1 -0.98	32
10.56	1 0.23	65.36	3 0.11	16.51	1 -0.38											33
10.22	1 -1.33	69.57	4 6.09	18.40	1 17.82											34
10.42	1 -0.41	65.23	4 -0.07	16.60	1 0.48											35
9.84	1 -3.09	65.18	1 -0.14	15.88	1 -6.45	0.92	3 -7.32			38.26	2 -2.27	36.39	2 -1.11			36
9.88	1 -2.90	63.44	4 -2.61	16.66	1 1.05	1.22	2 -1.54									37
		65.94	3 0.93													38
10.02	1 -2.25	66.18	3 1.27	16.49	1 -0.57									10.3	1 0.73	40
		65.67	2 0.55													41
10.54	1 0.13	65.01	2 -0.38	16.49	1 -0.57	1.27	2 -0.57									42
10.55	1 0.18	64.84	4 -0.62	16.50	1 -0.48											43
10.01	1 -2.30	64.57	4 -1.00	16.59	1 0.38	1.28	2 -0.38			37.26	1 -3.48	37.98	1 -0.23			44
10.21	1 -1.38	65.22	2 -0.08	16.83	1 2.69											45
10.43	1 -0.36	63.61	1 -2.37	16.61	1 0.57	1.48	1 3.46			40.11	1 -0.04					46
10.56	1 0.23	65.04	4 -0.34	16.71	1 1.54											47
10.51	1 0.00	65.15	1 -0.18	16.59	1 0.38	1.20	2 -1.92			40.29	1 0.16	35.87	1 -1.40			48
10.20	1 -1.42	63.82	2 -2.07	16.46	1 -0.86											50
10.48	1 -0.13	66.84	3 2.21	16.57	1 0.19					40.47	1 0.38					51
9.97	1 -2.49	66.97	4 2.39	16.77	1 2.11											52
10.65	1 0.64	63.76	4 -2.15	16.61	1 0.57											54
9.43	2 -4.98															55
10.08	1 -1.98	65.08	4 -0.28	16.56	1 0.09											56
10.14	1 -1.70	66.47	3 1.68	16.55	1 0.00											57
10.39	1 -0.55	66.10	3 1.16	16.62	1 0.67											58
10.35	1 -0.73	66.34	2 1.50	16.50	1 -0.48											59
10.26	2 -1.15	64.56	3 -1.02	16.65	2 0.96											60
		66.59	2 1.86													61
10.24	1 -1.24	64.92	4 -0.51	16.53	1 -0.19											62
10.20	1 -1.42	64.52	4 -1.07	16.63	1 0.77									10.2	1 0.49	64
10.21	1 -1.38	65.63	3 0.49	16.60	1 0.48											65
10.58	1 0.32	65.83	3 0.78	16.57	1 0.19	1.35	2 0.96	202.0	1 -1.34	40.33	1 0.21	38.52	1 0.06	10.7	1 1.71	66
10.53	1 0.09	64.48	2 -1.13	16.42	1 -1.25	1.28	2 -0.38			40.10	1 -0.06	38.87	1 0.26			67
10.67	1 0.73	65.75	3 0.66	16.48	1 -0.67											68
		65.12	4 -0.22													68
10.66	1 0.69									37.54	1 -3.14	35.65	1 -1.52	10.2	1 0.49	69
10.62	1 0.50	65.20	1 -0.11	16.48	1 -0.67	1.33	1 0.57			40.61	1 0.55	38.19	1 -0.11			70
		65.23	3 -0.07													70
		65.14	4 -0.19													70
10.60	1 0.41	65.61	3 0.46	16.39	1 -1.54	1.27	2 -0.57			40.96	1 0.97	38.92	1 0.28			71
10.47	1 -0.18			16.60	1 0.48	1.09	2 -4.04			37.47	1 -3.22	35.48	1 -1.62	10.1	1 0.24	72
10.52	1 0.04	64.60	2 -0.96	16.60	1 0.48	1.30	1 0.00			40.83	1 0.81	40.67	1 1.26			74
10.64	1 0.59	65.27	1 -0.01	16.45	1 -0.96	1.30	2 0.00			40.64	1 0.59	38.85	1 0.25			75
10.24	1 -1.24	65.76	3 0.68	16.62	1 0.67			253.8	1 1.76							76
		65.80	3 0.73													77
10.68	1 0.78	64.89	4 -0.55	16.60	1 0.48	1.30	2 0.00									78
10.54	1 0.13	55.51	1 -13.87	16.58	1 0.28					39.01	1 -1.37	36.50	1 -1.05			79
																80
10.30	1 -0.96									40.09	1 -0.07	35.99	1 -1.34	9.9	1 -0.24	81
10.83	1 1.47	62.31	1 -4.21	16.67	1 1.15											82
10.63	1 0.55	65.67	3 0.55	16.41	1 -1.34											83
10.60	1 0.41	65.25	3 -0.04	16.75	1 1.92	1.24	2 -1.15	217.0	1 -0.44	42.96	1 3.38	38.46	1 0.03	10.5	1 1.22	84
10.37	1 -0.64	65.84	3 0.79	16.65	1 0.96	1.31	2 0.19	247.8	1 1.40	39.81	1 -0.40	39.20	1 0.44	10.0	1 0.00	86

表5 A, B 及び D 試料

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(管理分析法)		SL(飼料分析基準)	
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score
88	11.71	1 -1.61	18.49	4 0.77	4.25	2 0.00	3.50	3 0.00	6.07	1 -0.55	1.040	1 -1.17	0.876	1 -0.48				
89	12.39	1 0.82	18.37	3 0.28	4.24	1 -0.07	3.33	3 -0.58	5.97	1 -1.34	1.076	2 -0.47	0.878	1 -0.36			53.0	3 0.20
89			18.22	4 -0.32														
90	12.12	1 -0.14	18.40	3 0.40			3.63	4 0.44	6.11	1 -0.23	1.067	2 -0.64	0.868	1 -0.93				
91	12.40	1 0.86	17.72	1 -2.37	4.31	1 0.47	3.55	2 0.17	5.92	1 -1.74	1.148	2 0.94	0.889	1 0.25				
92			17.93	1 -1.51	3.51	1 -5.87	3.40	1 -0.34	5.97	1 -1.34	1.136	1 0.70	0.904	1 1.10				
93	12.21	1 0.17	18.31	3 0.04	3.74	1 -4.04			6.16	1 0.15	1.098	2 -0.03	0.893	1 0.48				
94	12.29	1 0.46	18.24	3 -0.24	4.28	1 0.23	3.13	2 -1.27	6.21	1 0.55	1.075	1 -0.49	0.897	1 0.70	52.6	1 0.00		
95	12.17	1 0.03	18.44	3 0.57	4.20	1 -0.39												
96	12.34	1 0.64	18.49	3 0.77	4.28	1 0.23	3.52	3 0.06	6.20	1 0.47	1.084	2 -0.31	0.885	1 0.02				
97																		
98			18.42	3 0.49														
100	12.33	1 0.61	18.25	4 -0.20	4.31	1 0.47	3.49	3 -0.03	6.15	1 0.07	1.102	2 0.03	0.845	1 -2.24				
101	12.54	1 1.36	18.55	3 1.02	4.11	1 -1.11	3.74	2 0.83	6.04	1 -0.79								
102	12.46	1 1.07	18.27	4 -0.12	4.32	1 0.55			6.15	1 0.07	1.121	2 0.41	0.894	1 0.53				
106	12.37	1 0.75	17.99	4 -1.26	4.06	2 -1.50	4.13	3 2.17	6.02	1 -0.95	1.102	2 0.03	0.884	1 -0.02				
107	12.05	1 -0.39	18.68	3 1.55	4.29	1 0.31	3.57	1 0.24	6.18	1 0.31	1.075	2 -0.49	0.900	1 0.88				
107			18.01	4 -1.18														
108	11.34	2 -2.94	16.07	1 -9.11														
109	12.38	1 0.79	18.02	3 -1.14	4.36	1 0.87	3.48	2 -0.06	6.12	1 -0.15	1.090	2 -0.19	0.905	1 1.16			53.3	3 0.32
109			18.24	4 -0.24														
110	7.87	1 -15.43	1.89	2 -67.08	4.50	2 1.98	12.73	3 31.92	6.62	1 3.80	1.402	2 5.92	0.892	1 0.42				
111	12.15	1 -0.03	18.05	3 -1.02	4.17	2 -0.63	2.94	4 -1.93	6.03	1 -0.87	1.077	2 -0.45	0.889	1 0.25				
111			18.02	4 -1.14														
113	12.25	1 0.32	18.34	3 0.16	4.24	1 -0.07	3.54	2 0.13	6.06	1 -0.63	1.081	2 -0.37	0.889	1 0.25				
114	12.11	1 -0.17	18.58	3 1.14	4.17	1 -0.63			6.24	1 0.79	1.107	2 0.13	0.883	1 -0.08	52.4	2 -0.05		
115	12.27	1 0.39	18.26	4 -0.16	4.23	1 -0.15	3.77	3 0.93	6.00	1 -1.11	1.101	2 0.01	0.891	1 0.36	56.5	1 1.01		
116	12.02	1 -0.50	18.45	3 0.61	4.21	1 -0.31	3.64	2 0.48	6.10	1 -0.31	1.160	2 1.17	0.865	1 -1.10				
117	12.51	1 1.25	18.32	3 0.08	4.17	2 -0.63			6.19	1 0.39	1.118	2 0.35	0.883	1 -0.08	48.7	1 -1.01		
118	12.16	1 0.00	18.33	3 0.12	4.36	1 0.87	3.72	3 0.76	6.28	1 1.11	1.070	2 -0.58	0.891	1 0.36	51.4	1 -0.31		
119	12.24	1 0.28	18.35	3 0.20	4.22	1 -0.23	3.50	2 0.00	6.14	1 0.00	1.080	2 -0.39	0.887	1 0.14	54.7	1 0.54		
120	12.46	1 1.07	18.57	3 1.10					6.20	1 0.47	1.048	2 -1.02	0.887	1 0.14				
121	12.51	1 1.25	18.72	3 1.71	4.08	2 -1.34			6.24	1 0.79	1.075	2 -0.49	0.880	1 -0.25			53.4	3 0.36
122	12.24	1 0.28	18.22	3 -0.32	4.27	2 0.15	3.50	2 0.00	6.35	1 1.66	1.169	2 1.35	0.874	1 -0.59	54.1	3 0.64		
123	12.52	1 1.29	18.51	3 0.85	4.17	2 -0.63	3.84	3 1.17	5.95	1 -1.50	1.075	2 -0.49	0.890	1 0.31				
124	12.32	1 0.57	18.02	5 -1.14	4.39	2 1.11	4.55	3 3.63	6.22	1 0.63								
125	11.89	1 -0.97	18.13	2 -0.69	4.06	2 -1.50			6.09	1 -0.39	1.345	2 4.80	0.895	1 0.59				
126	12.03	1 -0.46	17.90	2 -1.63	4.22	1 -0.23	3.51	2 0.03	6.24	1 0.79	1.089	2 -0.21	0.875	1 -0.53	56.7	1 1.06	50.7	3 -0.72
126																	51.2	4 -0.52
137	12.05	1 -0.39													52.6	1 0.00		
138	12.26	1 0.35	18.16	3 -0.57	4.25	2 0.00	3.71	2 0.72	6.21	1 0.55	1.107	2 0.13	0.897	1 0.70				
138			17.98	4 -1.30			4.13	3 2.17										
139	12.11	1 -0.17	18.26	1 -0.16	4.32	1 0.55			5.75	1 -3.09	1.053	2 -0.92	0.870	1 -0.82				
142			18.47	3 0.69	4.26	2 0.07												
143	10.19	1 -7.08	17.93	4 -1.51	4.34	1 0.71												
145	12.29	1 0.46	17.92	2 -1.55	4.19	1 -0.47			6.33	1 1.50								
146	12.06	2 -0.35	15.98	3 -9.48					5.87	2 -2.14								
147	12.46	1 1.07	18.44	2 0.57	4.19	1 -0.47	3.48	2 -0.06	5.89	1 -1.98								
147			17.95	3 -1.43														
148	12.43	1 0.97	17.80	3 -2.04					6.19	1 0.39	1.000	2 -1.96	0.879	1 -0.31			48.8	3 -1.48
149	12.41	1 0.89	18.42	3 0.49	3.93	2 -2.53	4.21	3 2.45	6.34	1 1.58	1.140	2 0.78	0.883	1 -0.08				
150	12.40	1 0.86	18.56	3 1.06	4.02	2 -1.82			6.20	1 0.47								
151	12.01	1 -0.53	18.43	4 0.53	4.21	1 -0.31	3.73	2 0.79	10.11	1 31.50	1.321	1 4.33	0.775	1 -6.21				
152	12.12	1 -0.14	18.37	3 0.28					6.10	1 -0.31								
153	12.03	1 -0.46	18.28	4 -0.08	4.00	2 -1.98	3.44	3 -0.20	6.23	1 0.71	1.240	1 2.74	0.910	1 1.44			56.4	3 1.57
154	12.33	1 0.61	18.47	3 0.69					6.16	1 0.15	1.086	2 -0.27	0.895	1 0.59				
155	12.23	1 0.25	18.14	3 -0.65	4.42	1 1.34	3.34	2 -0.55	6.21	1 0.55	1.061	1 -0.76			51.4	3 -0.44		
156	12.44	1 1.00	18.25	4 -0.20	4.25	1 0.00	3.04	2 -1.59	6.06	1 -0.63	1.145	2 0.88	0.874	1 -0.59	50.4	3 -0.84		
157	12.44	1 1.00	18.37	3 0.28	3.92	1 -2.61	3.80	2 1.03	5.80	1 -2.69	1.151	1 1.00	0.887	1 0.14				
158	12.28	1 0.43	18.49	3 0.77	4.16	1 -0.71	3.48	2 -0.06	6.21	1 0.55	1.027	2 -1.43	0.826	1 -3.32				
159	12.38	1 0.79	18.00	4 -1.22	4.23	2 -0.15			6.11	1 -0.23	1.137	2 0.72	0.897	1 0.70	53.4	2 0.20		
160	12.16	1 0.00	18.14	4 -0.65			3.45	2 -0.17	6.19	1 0.39								
161	12.26	1 0.35	18.39	3 0.36	4.19	2 -0.47	4.17	3 2.31	6.14	1 0.00	1.111	2 0.21	0.894	1 0.53			56.1	3 1.45
162	12.52	1 1.29	18.03	4 -1.10	4.21	1 -0.31	3.45	2 -0.17	6.17	1 0.23	1.168	1 1.33	0.900	1 0.88			50.1	3 -0.97
163	12.57	1 1.47	18.36	4 0.24	4.23	1 -0.15			5.91	1 -1.82								
164	12.04	1 -0.43	18.77	3 1.92					6.18	1 0.31	1.237	2 2.68	2.087	2 68.50				
165	12.29	1 0.46	18.31	3 0.04	4.21	2 -0.31			5.83	1 -2.45			0.899	2 0.82				
166	10.80	1 -4.89	18.09	4 -0.85	4.21	1 -0.31	3.15	1 -1.21	6.04	1 -0.79			0.888	1 0.19				
167	12.54	1 1.36	18.25															



の分析成績 (2)

B試料				D試料								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	
10.00	1 -2.35	65.05	4 -0.32	10.50	1 -58.29											88
10.63	1 0.55	65.71	3 0.61	16.62	1 0.67			220.0	1 -0.26	40.31	1 0.19	38.27	1 -0.07	9.8	1 -0.49	89
		65.39	4 0.15													89
10.41	1 -0.46	65.60	3 0.45	16.58	1 0.28	1.30	2 0.00									90
10.59	1 0.36	64.04	1 -1.76	16.48	1 -0.67	1.31	2 0.19			41.30	1 1.38	38.40	1 0.00			91
																92
10.65	1 0.64	66.14	3 1.22	16.43	1 -1.15	1.29	2 -0.19			40.00	1 -0.18	38.20	1 -0.11			93
10.41	1 -0.46	65.63	3 0.49	16.58	1 0.28											94
10.60	1 0.41	66.00	3 1.02													95
10.66	1 0.69	65.48	3 0.28	16.49	1 -0.57	1.21	3 -1.73	207.5	1 -1.01	38.90	1 -1.50	37.85	1 -0.30			96
9.60	1 -4.19	65.74	2 0.65	15.66	1 -8.57											97
		67.29	3 2.85													98
10.59	1 0.36	65.29	4 0.01	16.47	1 -0.77	1.33	1 0.57	218.0	1 -0.38	39.30	1 -1.02	37.02	1 -0.76			100
10.69	1 0.83	65.97	3 0.97	16.49	1 -0.57											101
10.67	1 0.73	65.02	4 -0.36	16.49	1 -0.57	1.34	1 0.77	238.0	1 0.81	40.23	1 0.09	38.50	1 0.05			102
																106
10.60	1 0.41	64.74	4 -0.76	16.50	1 -0.48					40.76	1 0.73	38.84	1 0.24			106
10.43	1 -0.36	66.08	3 1.13	16.51	1 -0.38					40.33	1 0.21	38.77	1 0.20			107
		64.90	4 -0.53													107
11.09	2 2.67	63.56	1 -2.44													108
10.61	1 0.46	65.30	3 0.02	16.53	1 -0.19	1.29	2 -0.19	225.1	1 0.04	40.22	1 0.08	41.43	1 1.68	10.0	1 0.00	109
		65.25	4 -0.04													109
8.06	1 -11.29	6.77	2 -83.08	17.20	1 6.26	1347.91	3 2881.09			41.45	1 1.56	47.16	1 4.87			110
10.47	1 -0.18	64.85	3 -0.61	16.48	1 -0.67			226.4	1 0.12	40.19	1 0.04	36.81	1 -0.88	10.3	1 0.73	111
		64.51	4 -1.09													111
10.63	1 0.55	65.59	3 0.44	16.55	1 0.00	1.32	2 0.38			39.37	1 -0.93	37.27	1 -0.62			113
																114
10.51	1 0.00	65.65	3 0.52	16.57	1 0.19											114
10.54	1 0.13	64.98	4 -0.42	16.46	1 -0.86	1.30	2 0.00			39.68	1 -0.56	37.82	1 -0.32	9.6	1 -0.98	115
10.31	1 -0.92	66.20	3 1.30	16.58	1 0.28											116
10.71	1 0.92	65.14	3 -0.19	16.55	1 0.00											117
10.62	1 0.50	65.60	3 0.45	16.59	1 0.38					39.85	1 -0.36					118
10.52	1 0.04	65.86	3 0.82	16.68	1 1.25					41.24	1 1.31	37.57	1 -0.46			119
10.64	1 0.59	65.95	3 0.95	16.60	1 0.48											120
10.74	1 1.06	65.42	3 0.19	16.66	1 1.05					40.36	1 0.25	36.29	1 -1.17			121
10.55	1 0.18	65.56	3 0.39	16.50	1 -0.48									9.6	1 -0.98	122
10.90	1 1.79	65.67	3 0.55	16.53	1 -0.19	1.32	2 0.38									123
																124
10.19	1 -1.47	65.22	2 -0.08	16.56	1 0.09	1.30	2 0.00									125
10.44	1 -0.32	64.44	2 -1.19	16.61	1 0.57	1.35	2 0.96	223.5	1 -0.05	41.63	1 1.78	39.00	1 0.33	9.9	1 -0.24	126
																126
10.66	1 0.69							211.9	1 -0.74	39.40	1 -0.90	36.20	1 -1.22	10.1	1 0.24	137
10.66	1 0.69	65.71	3 0.61	16.51	1 -0.38					38.28	1 -2.25	36.20	1 -1.22			138
		64.28	4 -1.42													138
		65.94	3 0.93							42.63	1 2.98	39.21	1 0.45			139
9.30	1 -5.58	63.35	4 -2.74													142
																143
10.40	1 -0.50	64.06	2 -1.73	16.76	1 2.02											145
10.55	2 0.18	64.73	3 -0.78	16.52	2 -0.28											146
10.62	1 0.50	65.39	2 0.15	16.36	1 -1.83											147
		68.24	3 4.20													147
10.65	1 0.64	64.44	3 -1.19	16.48	1 -0.67					40.12	1 -0.03	37.00	1 -0.77	10.3	1 0.73	148
10.60	1 0.41	65.79	3 0.72	16.55	1 0.00					38.17	1 -2.38					149
10.68	1 0.78	66.34	3 1.50	16.54	1 -0.09											150
10.35	1 -0.73	65.02	4 -0.36	22.50	1 57.33											151
10.41	1 -0.46	65.21	3 -0.09	16.58	1 0.28											152
10.43	1 -0.36	65.19	4 -0.12	16.68	1 1.25			212.3	1 -0.72					8.9	1 -2.69	153
																154
10.64	1 0.59	65.34	3 0.08	16.56	1 0.09											154
10.54	1 0.13	65.61	3 0.46	16.48	1 -0.67											155
10.65	1 0.64	64.10	4 -1.67	16.52	1 -0.28			240.0	1 0.93	41.18	1 1.24	40.02	1 0.90	10.0	1 0.00	156
10.68	1 0.78	65.75	3 0.66	16.55	1 0.00											157
10.50	1 -0.04	65.68	3 0.56	16.49	1 -0.57			223.6	1 -0.04	32.71	1 -8.96	34.02	1 -2.43			158
10.59	1 0.36	63.62	4 -2.35	16.49	1 -0.57											159
10.48	1 -0.13	64.13	4 -1.63	16.51	1 -0.38											160
10.61	1 0.46	66.22	3 1.33	16.66	1 1.05					39.96	1 -0.22	34.20	1 -2.33	10.2	1 0.49	161
10.66	1 0.69	65.06	4 -0.31	16.47	1 -0.77									10.3	1 0.73	162
10.70	1 0.87	65.37	4 0.12	16.42	1 -1.25											163
																164
10.43	1 -0.36	65.55	3 0.38	16.65	1 0.96											165
																165
9.66	1 -3.92	63.38	4 -2.69	16.28	1 -2.60											166
10.70	1 0.87	64.75	1 -0.75	16.27	1 -2.69											167
10.59	1 0.36	65.58	3 0.42	16.61	1 0.57											168
10.47	1 -0.18	65.04	1 -0.34	16.55	1 0.00											169
9.51	1 -4.61			16.40	1 -1.44											170
10.68	1 0.78			16.26	2 -2.79											171
10.60	1 0.41	63.78	2 -2.12	16.60	1 0.48											172
10.46	1 -0.23	65.68	4 0.56	16.71	1 1.54			201.2	1 -1.38							174

表5 A, B 及び D 試料

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(管理分析法)		SL(飼料分析基準)	
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score
175	11.97	1 -0.68	18.25	4 -0.20	4.10	2 -1.19	3.96	2 1.59	6.06	1 -0.63	1.147	2 0.92	0.780	1 -5.93				
176	12.29	1 0.46	18.30	4 0.00	4.37	1 0.95	3.23	2 -0.93	5.79	1 -2.77	1.071	2 -0.56	0.876	1 -0.48				
177	11.98	1 -0.64	18.38	2 0.32	4.61	1 2.85	3.82	2 1.10	5.90	1 -1.90								
178	11.50	1 -2.37	18.28	2 -0.08	4.40	1 1.19	3.55	2 0.17	6.22	1 0.63	1.004	2 -1.88	0.896	1 0.65				
179	12.20	1 0.14	18.27	4 -0.12	4.37	1 0.95	3.09	2 -1.41	6.15	1 0.07	1.149	2 0.96	0.451	1 -24.62				
181	12.07	1 -0.32	18.50	1 0.81	4.19	1 -0.47	3.55	2 0.17	6.21	1 0.55	1.059	2 -0.80	0.892	1 0.42			54.9	4 0.97
181			18.23	3 -0.28														
191	11.83	1 -1.18	17.41	4 -3.63	3.76	2 -3.88	3.57	3 0.24	6.02	1 -0.95								
192	13.23	1 3.84	18.67	3 1.51	4.05	1 -1.58	3.13	2 -1.27	5.97	1 -1.34								
193	12.24	1 0.28	18.25	2 -0.20	4.23	1 -0.15	2.79	2 -2.45	5.94	1 -1.58	1.171	2 1.39	0.898	1 0.76				
194	11.64	1 -1.87	18.18	2 -0.49	4.35	1 0.79	3.66	2 0.55	6.19	1 0.39	1.154	2 1.05	0.895	1 0.59			58.4	1 1.50
195	12.43	1 0.97	18.40	3 0.40	4.46	1 1.66	3.22	2 -0.96	6.29	1 1.19	1.054	2 -0.90	0.848	1 -2.07				
196	11.56	1 -2.15	17.98	3 -1.30	4.30	2 0.39	3.40	2 -0.34	5.84	1 -2.38								
197	12.30	1 0.50	18.35	1 0.20	4.38	1 1.03	3.53	2 0.10	6.16	1 0.15	1.110	1 0.19	0.880	1 -0.25				
198	12.48	1 1.15	18.19	3 -0.44	4.10	2 -1.19			6.23	1 0.71								
199	11.77	1 -1.40	18.52	3 0.89	4.13	2 -0.95	3.24	1 -0.89	6.08	1 -0.47	1.092	2 -0.15	0.878	1 -0.36			55.9	3 1.37
200	12.02	1 -0.50	18.16	4 -0.57	3.98	1 -2.14			6.04	1 -0.79								
201	12.31	1 0.53	18.31	3 0.04	4.66	1 3.25	4.21	2 2.45	5.97	1 -1.34	0.814	2 -5.61	0.846	1 -2.18			52.1	3 -0.16
202	11.57	1 -2.12	18.10	2 -0.81	4.03	1 -1.74	3.49	1 -0.03	6.18	1 0.31	1.132	2 0.62	0.876	1 -0.48				
203	12.20	1 0.14					2.81	2 -2.38	6.19	1 0.39					52.2	1 -0.10		
204	12.11	1 -0.17	18.14	4 -0.65	4.01	1 -1.90			6.13	1 -0.07								
205	12.38	1 0.79	18.13	4 -0.69	4.30	1 0.39	3.25	2 -0.86	6.12	1 -0.15	1.071	2 -0.56	0.871	1 -0.76				
206	12.54	1 1.36	18.40	2 0.40	4.36	1 0.87	3.18	2 -1.10	6.04	1 -0.79	1.154	1 1.05	0.844	1 -2.30				
207	12.09	1 -0.25	18.43	3 0.53	4.08	2 -1.34			6.26	1 0.95	1.092	2 -0.15	0.857	1 -1.56			58.5	3 2.42
208																		
209	12.30	1 0.50	18.49	3 0.77	4.11	2 -1.11			6.23	1 0.71								
210	11.84	1 -1.15	17.95	4 -1.43	4.21	1 -0.31	3.59	2 0.31	6.17	1 0.23	1.061	1 -0.76	0.907	1 1.27	56.4	2 0.97		
211	12.56	1 1.43	18.27	2 -0.12	4.40	1 1.19	3.33	2 -0.58	5.99	1 -1.19	1.100	2 0.00	0.887	1 0.14				
212	12.20	1 0.14	18.42	3 0.49	4.12	1 -1.03	3.52	3 0.06	6.16	1 0.15	1.055	2 -0.88	0.882	1 -0.14				
213	12.92	1 2.73	18.38	2 0.32	4.09	1 -1.26	3.40	2 -0.34	6.17	1 0.23	1.032	2 -1.33	0.878	1 -0.36				
214	12.42	1 0.93	18.20	2 -0.40	4.28	1 0.23	3.02	2 -1.66	6.19	1 0.39	1.113	1 0.25	0.895	1 0.59			53.2	3 0.28
215	12.17	1 0.03	18.50	3 0.81	4.26	2 0.07	3.74	2 0.83	6.24	1 0.79								
216	12.40	1 0.86	17.95	2 -1.43	4.52	1 2.14	2.94	2 -1.93	5.88	1 -2.06								
217	12.27	1 0.39	18.18	3 -0.49	4.45	1 1.58	3.47	2 -0.10	6.12	1 -0.15	1.170	1 1.37	0.891	1 0.36	57.2	1 1.19		
218	11.68	1 -1.72	18.45	3 0.61	4.27	1 0.15			6.28	1 1.11	1.169	2 1.35	0.866	1 -1.05	54.4	2 0.46		
219	10.68	1 -5.32	17.93	4 -1.51	4.43	1 1.42	4.07	3 1.97	5.75	1 -3.09	1.075	2 -0.49	0.876	1 -0.48				
220	11.84	1 -1.15	17.72	2 -2.37	4.47	1 1.74	3.91	2 1.41	5.87	1 -2.14	0.907	2 -3.78	0.876	1 -0.48				
221	11.94	1 -0.79	18.25	4 -0.20	4.21	1 -0.31	3.18	1 -1.10	6.07	1 -0.55	1.105	1 0.09	0.901	1 0.93				
222	11.82	1 -1.22	18.02	2 -1.14														
223	11.44	1 -2.59	19.31	3 4.12	3.54	2 -5.63												
224	12.37	1 0.75	17.89	1 -1.67	4.25	1 0.00	4.25	2 2.59	5.94	1 -1.58	1.106	2 0.11	0.910	1 1.44				
225	12.00	1 -0.57	18.35	4 0.20	4.16	1 -0.71	3.33	2 -0.58	6.04	1 -0.79	1.108	2 0.15	0.839	1 -2.58			51.3	3 -0.48
226	12.30	1 0.50	18.59	2 1.18	4.39	1 1.11			6.16	1 0.15								
227	11.84	1 -1.15	18.52	4 0.89	4.19	2 -0.47			6.20	1 0.47			0.883	1 -0.08				
228	12.21	1 0.17	18.63	3 1.34	4.10	1 -1.19	3.40	1 -0.34	6.19	1 0.39	1.031	1 -1.35	0.898	1 0.76				
229	12.22	1 0.21	18.28	4 -0.08	4.13	2 -0.95	3.41	1 -0.31	6.23	1 0.71	1.158	2 1.13	0.898	1 0.76			48.8	3 -1.49
230	12.47	1 1.11	18.43	3 0.53	4.14	1 -0.87	3.41	2 -0.31	6.08	1 -0.47	1.077	2 -0.45	0.858	1 -1.50			60.0	3 3.03
231	12.06	1 -0.35	18.23	4 -0.28	4.06	2 -1.50	3.28	2 -0.76	6.14	1 0.00	1.100	1 0.00	0.830	1 -3.09	57.2	1 1.19		
232	12.20	1 0.14	18.27	4 -0.12	4.08	2 -1.34	3.69	4 0.65	6.24	1 0.79	1.104	1 0.07	0.873	1 -0.65			58.4	3 2.38
233	11.88	1 -1.00	18.37	2 0.28					5.88	1 -2.06								
234	12.02	1 -0.50	18.21	2 -0.36	4.47	1 1.74	3.81	2 1.07	6.22	1 0.63	1.141	2 0.80	0.884	1 -0.02			49.5	4 -1.21
251	12.37	1 0.75	18.11	2 -0.77	4.29	1 0.31	3.48	2 -0.06	5.94	1 -1.58	1.069	2 -0.60	0.887	1 0.14				
252			18.47	3 0.69	4.26	2 0.07												
253	11.28	1 -3.16	18.11	3 -0.77	4.16	1 -0.71			6.17	1 0.23	1.173	2 1.43	0.867	1 -0.99				
254	11.80	1 -1.29	18.22	4 -0.32	4.20	1 -0.39	3.09	2 -1.41	6.27	1 1.03	1.094	2 -0.11	0.894	1 0.53			54.5	3 0.78
255	12.36	1 0.71	18.31	3 0.04	4.24	2 -0.07	3.50	1 0.00	6.17	1 0.23	1.094	2 -0.11	0.894	1 0.53	51.1	2 -0.38	53.4	3 0.36
256	12.55	1 1.40	18.22	3 -0.32	4.28	1 0.23	3.34	2 -0.55	6.21	1 0.55	1.058	2 -0.82	0.891	1 0.38			51.3	4 -0.48
257	11.03	1 -4.06							6.03	1 -0.87							52.4	3 -0.04
258	12.05	1 -0.39	18.14	4 -0.65	4.37	1 0.95	3.42	2 -0.27	6.24	1 0.79			0.476	1 -23.20				
259	11.73	1 -1.54	18.36	3 0.24					6.23	1 0.71					51.8	2 -0.20		
260	12.08	1 -0.28	18.52	3 0.89	3.90	1 -2.77	2.71	1 -2.73	5.96	1 -1.42	1.056	2 -0.86	0.857	1 -1.56	59.0	1 1.66		
261	12.87	1 2.55	18.06	3 -0.98	4.38	1 1.03	3.14	2 -1.24	6.04	1 -0.79	0.990	2 -2.15	0.843	1 -2.35			52.5	3 0.00
262	12.29	1 0.46	18.40	3 0.40	3.81	2 -3.49	3.54	3 0.13	5.94	1 -1.58	1.042	2 -1.13	0.928	1 2.47				
263	12.16	1 0.00	18.74	3 1.79	4.11	2 -1.11	3.30	1 -0.69	6.17	1 0.23	1.205	2 2.06	0.870	1 -0.82				
264	12.40	1 0.86	18.67	2 1.51	4.31	1 0.47			6.10	1 -0.31	1.149	1 0.96	0.882	1 -0.14				
265	12.61	1 1.61	18.33	3 0.12					6.11	1 -0.23					48.7	1 -1.00		
266	12.06	1 -0.35	18.54	3 0.98					6.23	1 0.71	1.062	2 -0.74	0.874	1 -0.59				
267	12.08	1 -0.28	18.36	3 0.24	4.58	1 2.61	3.75	2 0.86	5.95	1 -1.50	1.069	2 -0.60	0.857	1 -1.56			53.4	3 0.36
268	11.90	1 -0.93	18.01	4 -1.18	4.26	1 0.07	3.62	2 0.41	6.15	1 0.07	1.164	2 1.25	0.898	1 0.76	54.8	1 0.56		
269	11.89	1 -0.97	18.36	2 0.24	4.59	1 2.69			6.09	1 -0.39	1.189	2 1.74	0.897	1 0.70				
270	12.65	1 1.76	18.24	3 -0.24	4.48	1 1.82	3.81	2 1.07	5.94	1 -1.58	1.228	1 2.51	0.877	1 -0.42			58.4	3 2.38
271	12.35	1 0.68	18.74	3 1.79					6.13	1 -0.07					49.8	2 -0.71		
272	12.46	1 1.07	18.17	4 -0.53	4.01	2 -1.90			6.17	1 0.23								
273	12.01	1 -0.53							5.78	1 -2.85</								



表5 A, B 及び D 試料

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(管理分析法)		SL(飼料分析基準)	
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score
275	12.35	1 0.68	18.33	2 0.12	4.31	1 0.47	3.49	2 -0.03	5.91	1 -1.82	1.025	2 -1.47	0.928	1 2.47				
276	11.63	1 -1.90	18.85	3 2.24					6.15	1 0.07	1.136	2 0.70	0.908	1 1.33				
277	12.00	1 -0.57	18.35	3 0.20	4.32	1 0.55			6.05	1 -0.71	1.110	2 0.19	0.894	1 0.53			49.3	3 -1.29
278	11.93	1 -0.82	18.41	3 0.44	4.26	2 0.07	3.16	2 -1.17	5.91	1 -1.82	1.149	2 0.96	0.883	1 -0.08	52.1	1 -0.12		
279	12.15	1 -0.03	18.52	3 0.89	4.08	2 -1.34	2.60	2 -3.11	6.03	1 -0.87	1.090	2 -0.19	0.860	1 -1.39	57.0	1 1.14		
280	12.27	1 0.39	18.03	4 -1.10	4.28	1 0.23	3.93	3 1.48	6.14	1 0.00	1.088	2 -0.23	0.899	1 0.82				
281	11.78	1 -1.36	17.80	2 -2.04	4.12	1 -1.03			5.97	1 -1.34								
282	12.07	1 -0.32	18.46	3 0.65	4.03	2 -1.74			6.16	1 0.18	1.151	1 1.00	0.896	1 0.65	51.7	2 -0.23		
283	11.77	1 -1.40	17.50	1 -3.27	4.34	1 0.71			6.25	1 0.87			0.588	1 -16.86				
284	12.24	1 0.28	18.05	4 -1.02	4.33	1 0.63			6.16	1 0.15								
285	11.82	1 -1.22	18.28	4 -0.08	4.04	1 -1.66	2.78	4 -2.49	6.13	1 -0.07	1.138	2 0.74	0.924	1 2.24				
286	12.50	1 1.22	18.33	3 0.12	3.98	2 -2.14	2.98	2 -1.79	6.24	1 0.79	1.176	2 1.49	0.913	1 1.61				
287	12.46	1 1.07	18.28	2 -0.08	4.39	1 1.11			6.14	1 0.00	1.043	2 -1.11	0.907	1 1.27				
288	12.30	1 0.50	18.46	3 0.65	4.52	2 2.14	3.56	2 0.20	6.14	1 0.00	1.106	1 0.11	0.885	1 0.02				
289	11.98	1 -0.64	18.59	3 1.18	4.10	2 -1.19	3.68	3 0.62	6.04	1 -0.79	1.086	2 -0.27	0.889	1 0.25				
290	11.84	1 -1.15	18.49	3 0.77	4.27	2 0.15			5.88	1 -2.06								
291	11.99	1 -0.61	18.04	2 -1.06	4.25	2 0.00			6.20	1 0.47	0.983	2 -2.29	0.873	1 -0.65				
292																		
293	11.89	1 -0.97	17.75	2 -2.24	4.52	1 2.14	3.61	2 0.38	6.19	1 0.39	1.092	2 -0.15	0.328	1 -31.60				
294	11.82	1 -1.22	18.52	3 0.89	4.33	1 0.63			6.05	1 -0.71	1.102	2 0.03	0.863	1 -1.22				
295	12.41	1 0.89	17.67	4 -2.57	4.07	1 -1.42	3.80	2 1.03	6.29	1 1.19								
296	12.21	1 0.17	18.27	4 -0.12	4.32	1 0.55			6.04	1 -0.79								
297	12.31	1 0.53	17.94	2 -1.47	4.37	1 0.95			6.05	1 -0.71								
298	12.38	1 0.79													53.4	1 0.20	51.0	3 -0.60
299	12.17	1 0.03	18.46	3 0.65	4.03	2 -1.74	3.27	2 -0.79	6.33	1 1.50	1.054	2 -0.90	0.941	1 3.20				
300	12.55	1 1.40	18.64	3 1.38	4.39	2 1.11	3.84	3 1.17	6.06	1 -0.63	1.120	2 0.39	0.878	1 -0.36			50.1	3 -0.97
301	11.51	1 -2.33	18.35	3 0.20	4.23	2 -0.15	3.41	4 -0.31	6.22	1 0.63	1.190	1 1.76	0.901	1 0.93	51.2	1 -0.35		

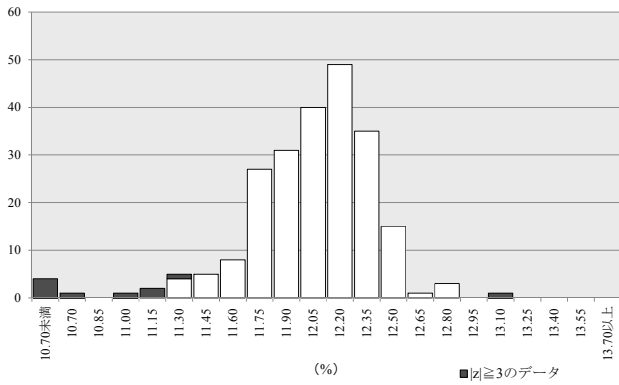
注1: z-scoreの欄に下線を付したものは、絶対値が3以上のものである。  
 注2: 各試料のNo.欄は、分析法を示す。対応は以下のとおりである。

水分	粗たん白質	粗脂肪	粗繊維	粗灰分	カルシウム	リン	サリノマイシンナトリウム (SL)
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	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	1 迅速定量法
2 その他	2 ホウ酸溶液吸収法	2 自動分析機	2 ろ過法	2 その他	2 原子吸光度法	2 その他	2 フローインジェクション法
	3 燃焼法	3 その他	3 自動分析機		3 その他		3 液体クロマトグラフ法
	4 自動分析機		4 その他				4 微生物学的定量法
	5 その他						

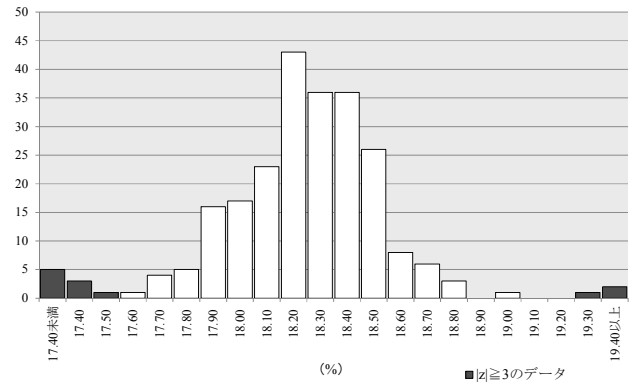
の分析成績 (4)

B試料				D試料								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	
10.61	1 0.46	64.94	2 -0.48	16.49	1 -0.57											275
10.14	1 -1.70	65.17	3 -0.15	16.49	1 -0.57											276
10.43	1 -0.36	66.03	3 1.06	16.59	1 0.38					40.74	1 0.71					277
10.35	1 -0.73	65.85	3 0.80	16.90	1 <u>3.37</u>					39.81	1 -0.40	42.80	1 2.44	9.2	1 -1.96	278
10.50	1 -0.04	65.86	3 0.82	16.41	1 -1.34					39.98	1 -0.20	39.04	1 0.35	8.6	1 <u>-3.43</u>	279
10.58	1 0.32	64.23	4 -1.49	16.49	1 -0.57											280
10.53	1 0.09	64.27	2 -1.43	16.35	1 -1.92											281
10.40	1 -0.50	65.86	3 0.82	16.46	1 -0.86											282
10.01	1 -2.30	63.89	1 -1.97	16.45	1 -0.96											283
10.51	1 0.00	65.18	4 -0.14	16.61	1 0.57											284
10.30	1 -0.96	65.29	4 0.01	16.65	1 0.96											285
10.65	1 0.64	65.82	3 0.76	16.56	1 0.09					39.07	2 -1.30	31.74	2 <u>-3.70</u>			286
10.75	1 1.10	65.17	2 -0.15	16.41	1 -1.34					41.45	1 1.56	39.44	1 0.57			287
10.53	1 0.09	65.55	3 0.38	16.54	1 -0.09					41.27	1 1.34	39.15	1 0.41			288
10.35	1 -0.73	65.92	3 0.90	16.48	1 -0.67	1.29	2 -0.19			38.39	1 -2.11	36.63	1 -0.98			289
10.33	1 -0.83	65.51	3 0.32	16.69	1 1.34											290
10.75	1 1.10	64.69	2 -0.83	16.54	1 -0.09					41.53	1 1.66	41.43	1 1.68			291
																292
10.37	1 -0.64	63.60	2 -2.38	16.65	1 0.96	0.83	1 <u>-9.05</u>	219.8	1 -0.27							293
10.15	1 -1.66	65.12	3 -0.22	13.13	1 <u>-32.95</u>											294
10.69	1 0.83	64.24	4 -1.47	16.94	1 <u>3.75</u>											295
10.61	1 0.46	65.46	4 0.25	16.57	1 0.19											296
10.66	1 0.69	64.60	2 -0.96	16.51	1 -0.38											297
10.58	1 0.32															298
10.22	1 -1.33	66.21	3 1.32	16.79	1 2.31			170.5	1 <u>-3.23</u>	40.43	1 0.33	38.75	1 0.19	9.7	1 -0.73	299
10.69	1 0.83	65.48	3 0.28	16.61	1 0.57			247.1	1 1.36	39.45	1 -0.84	38.53	1 0.07	10.2	1 0.49	300
10.17	1 -1.56	65.88	3 0.85	16.49	1 -0.57											301

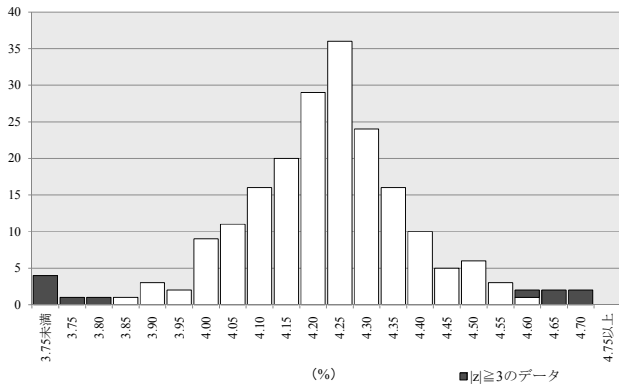
カドミウム      エトキシキン      銅      亜鉛      クエン酸モランテル  
 No. 分析方法      No. 分析方法      No. 分析方法      No. 分析方法      No. 分析方法  
 1 溶媒抽出法      1 飼料分析基準      1 飼料分析基準      1 飼料分析基準      1 飼料分析基準  
 2 簡易法      2 その他      2 その他      2 その他      2 その他  
 3 その他



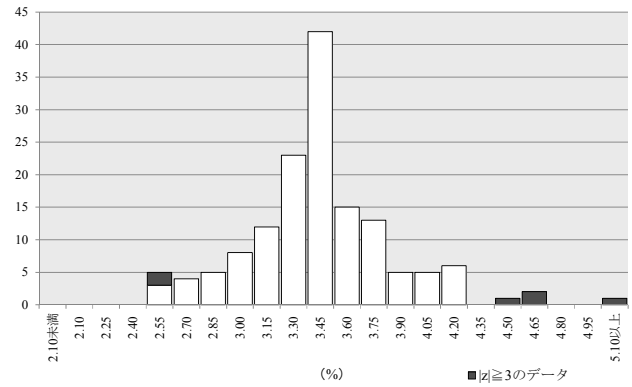
水分 (A 試料)



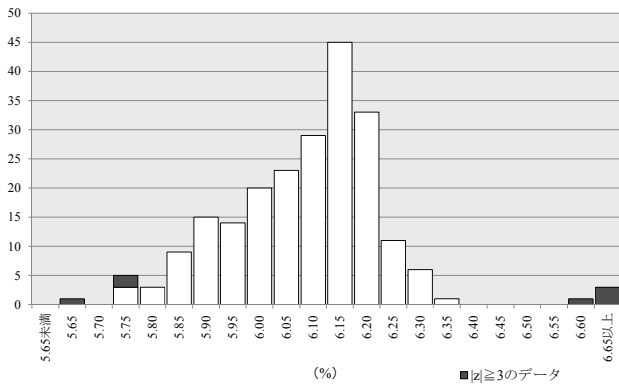
粗たん白質 (A 試料)



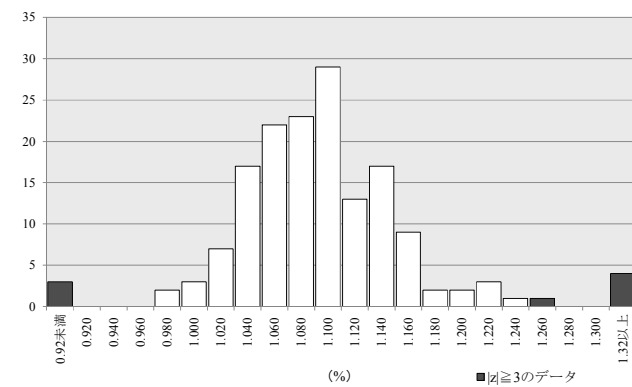
粗脂肪 (A 試料)



粗繊維 (A 試料)

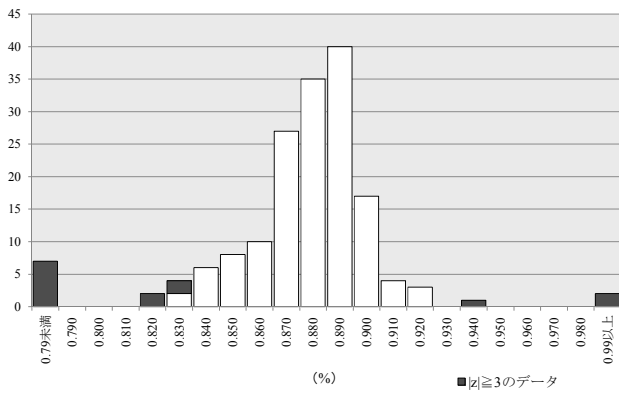


粗灰分 (A 試料)

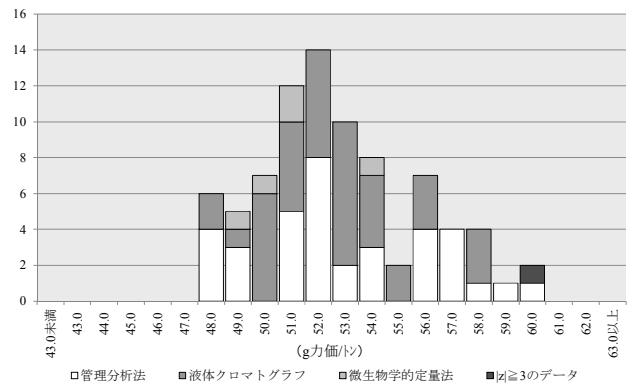


カルシウム (A 試料)

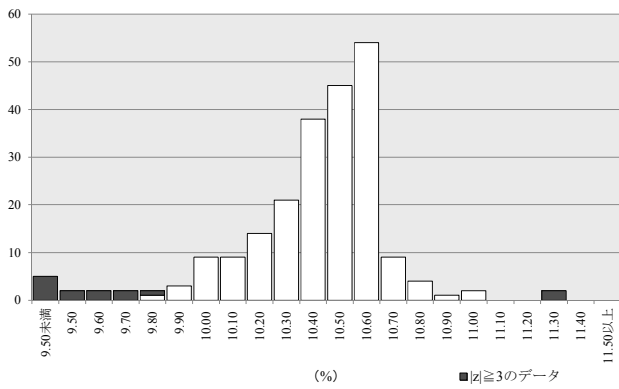
図 1 分析成績のヒストグラム (1)



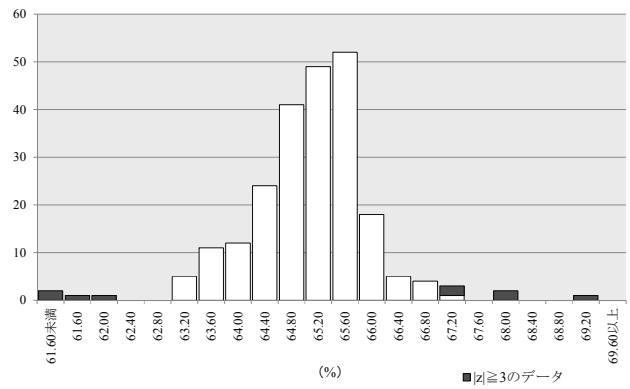
リン (A 試料)



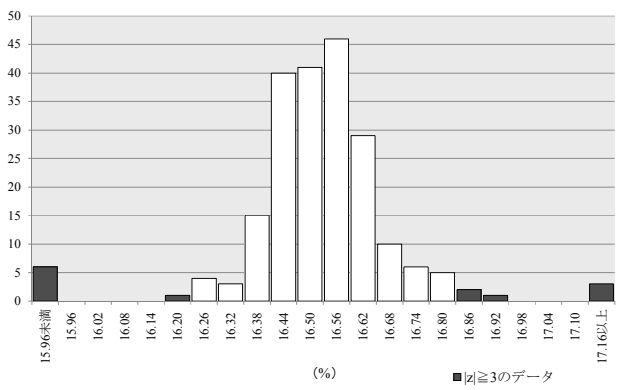
サリノマイシンナトリウム (A 試料)



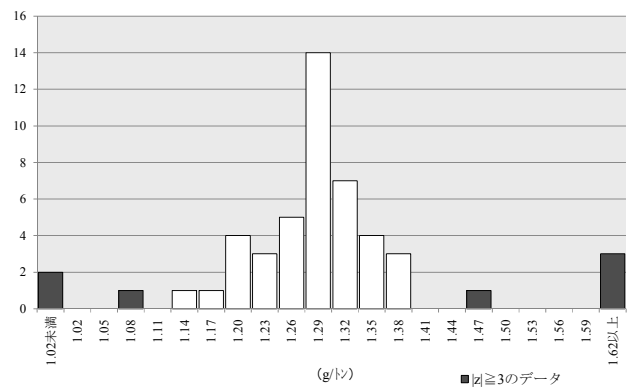
水分 (B 試料)



粗たん白質 (B 試料)

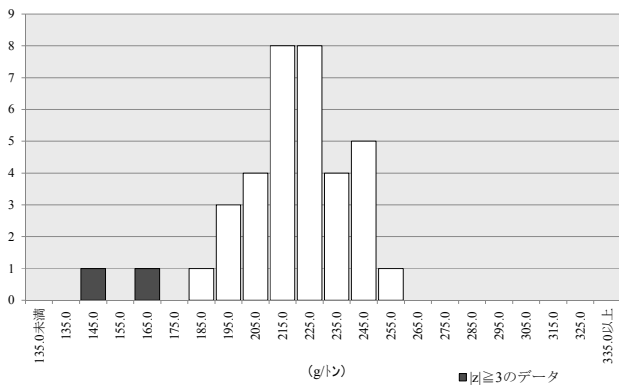


粗灰分 (B 試料)

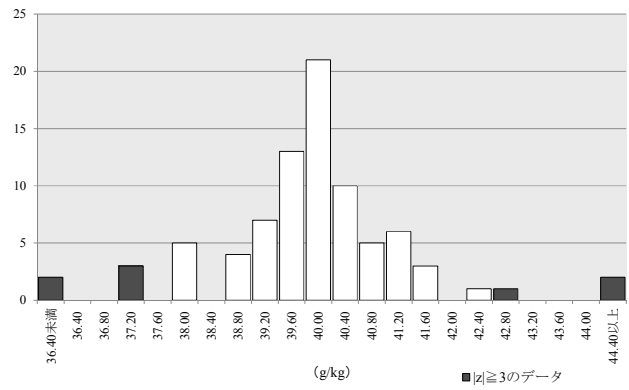


カドミウム (B 試料)

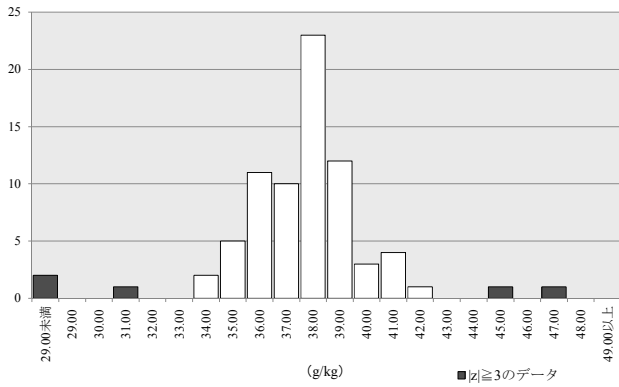
図 1 分析成績のヒストグラム (2)



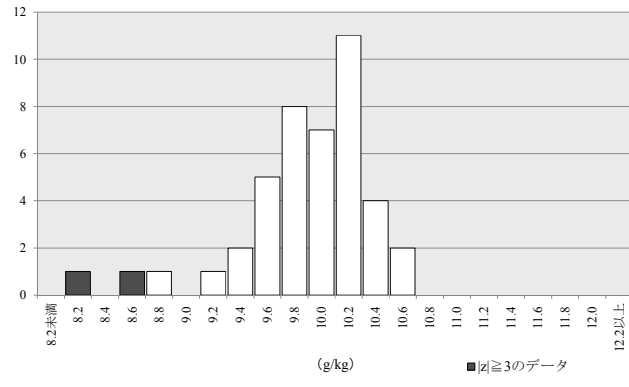
EtOxinin (B 試料)



銅 (D 試料)



亜鉛 (D 試料)



クエン酸モランテル (D 試料)

図1 分析成績のヒストグラム (3)



表 6 A 試料の解析結果

区分 <sup>注1</sup>	水分 (%)	粗たん白質 (%)	粗脂肪 (%)	粗繊維 (%)	粗灰分 (%)
データ数	228	237	203	147	219
1 中央値	12.16	18.30	4.25	3.50	6.14
1 下限境界値 <sup>注2</sup>	11.33	17.57	3.87	2.63	5.76
1 上限境界値 <sup>注2</sup>	12.99	19.03	4.63	4.37	6.52
2 平均値	12.14	18.30	4.25	3.50	6.10
2 標準偏差	0.28	0.24	0.14	0.35	0.12
2 変動係数(%)	2.3	1.3	3.3	9.9	2.0
95%信頼区間	12.11~12.18	18.27~18.33	4.23~4.27	3.44~3.56	6.09~6.12

区分	カルシウム (%)	リン (%)	SL(管理分析法) <sup>注3</sup> (g(力価)/トン)	SL(飼料分析基準) <sup>注4</sup> (g(力価)/トン)
データ数	158	166	36	46
1 中央値	1.100	0.885	52.6	52.5
1 下限境界値 <sup>注2</sup>	0.947	0.832	41.0	45.1
1 上限境界値 <sup>注2</sup>	1.253	0.937	64.2	59.9
2 平均値	1.102	0.884	53.5	52.8
2 標準偏差	0.049	0.017	3.3	2.5
2 変動係数(%)	4.5	2.0	6.1	4.8
95%信頼区間	1.094~1.109	0.881~0.887	52.4~54.5	52.1~53.6

注 1 区分 1 の数値は報告された分析値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 以上の異常値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 (管理分析法) は、サリノマイシンナトリウムの迅速定量法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 (飼料分析基準) は、サリノマイシンナトリウムの液体クロマトグラフ法及び微生物学的定量法を集計した結果である。

表 7 B 試料の解析結果

区分 <sup>注1</sup>	水分 (%)	粗たん白質 (%)	粗灰分 (%)	カドミウム (g/トン)	エトキシキン (g/トン)
データ数	224	231	212	49	36
1 中央値	10.51	65.28	16.55	1.30	224.4
1 下限境界値 <sup>注2</sup>	9.86	63.17	16.24	1.14	174.4
1 上限境界値 <sup>注2</sup>	11.16	67.39	16.86	1.46	274.3
2 平均値	10.48	65.26	16.55	1.29	226.0
2 標準偏差	0.21	0.74	0.10	0.06	16.2
2 変動係数(%)	2.0	1.1	0.6	4.3	7.2
95%信頼区間	10.45~10.51	65.16~65.36	16.54~16.57	1.28~1.31	220.6~231.5

注 1 区分 1 の数値は報告された分析値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 以上の異常値を除外して算出した結果である。

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 8 D 試料の解析結果

区 分 <sup>注1</sup>	銅 (g/kg)	亜鉛 (g/kg)	クエン酸モランテル (g/kg)
データ数	83	76	43
1 中央値	40.15	38.40	10.0
1 下限境界値 <sup>注2</sup>	37.66	33.01	8.8
1 上限境界値 <sup>注2</sup>	42.64	43.79	11.2
2 平均値	40.15	38.19	10.0
2 標準偏差	0.88	1.71	0.4
2 変動係数(%)	2.2	4.5	3.8
95%信頼区間	39.95~40.35	37.79~38.59	9.9~10.1

注 1 区分 1 の数値は報告された分析値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 以上の異常値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 混合した原料の鑑定成績

原 料 名	混合割合 (%)	試 験 室 数				検出率 (%)	
		検 出			不検出		
		多量 <sup>注1</sup>	中量 <sup>注2</sup>	少量 <sup>注3</sup>			計
とうもろこし	34	123	4	0	127	0	100
大 麦	18	81	34	0	115	12	91
玄 米	3	0	60	21	81	46	64
コーングルテンミール	10	0	78	34	112	15	88
大豆油かす	10	2	83	20	105	22	83
やし油かす	10	3	56	17	76	51	60
なたね油かす	7	2	93	29	124	3	98
魚 粉	3	0	15	89	104	23	82
リン酸カルシウム	3	0	1	78	79	48	62
食 塩	2	0	2	112	114	13	90

注 1 検出した原料の推定される混合割合が 15%以上と報告されたもの。

2 検出した原料の推定される混合割合が 5%以上 15%未満と報告されたもの。

3 検出した原料の推定される混合割合が 1%以上 5%未満と報告されたもの。

表 10 混合した原料以外に検出と報告されたもの

検出原料名	多量 <sup>注1</sup>	中量 <sup>注2</sup>	少量 <sup>注3</sup>	計
ライ麦	9	54	11	74
精白米	4	22	11	37
炭酸カルシウム	0	0	32	32
小麦	3	9	3	15
米ぬか	0	7	8	15
ビートパルプ	0	3	4	7
ふすま	0	3	4	7
スクリーニングペレット	2	3	0	5
キャッサバ	1	3	0	4
あまに油かす	0	2	1	3
麦ぬか	1	2	0	3
アルファルファミール	0	0	3	3
チキンミール	0	0	3	3
サフラワー油かす	1	0	1	2
マイロ	0	0	2	2
えん麦	1	1	0	2
コーングルテンフィード	0	1	2	3
ごま油かす	0	0	2	2
かに殻粉末	0	0	1	1
カボック油かす	1	0	0	1
小麦粉	0	1	0	1
肉骨粉	0	1	0	1
尿素	0	0	1	1
パイナップルかす	0	1	0	1
ビールかす	1	0	0	1
フェザーミール	0	0	1	1
綿実油かす	1	0	0	1

注 1 検出した原料の推定される混合割合が 15 %以上と報告されたもの。

2 検出した原料の推定される混合割合が 5 %以上 15 %未満と報告されたもの。

3 検出した原料の推定される混合割合が 1 %以上 5 %未満と報告されたもの。

## 8 各試料の解析結果及び鑑定成績

以下、分析法別の解析結果では、分析法別に分けたデータでロバスト法に基づく  $z$ -スコアを求め、その絶対値が 3 以上の分析値を異常値として棄却し、平均値、標準偏差及び相対標準偏差を求めた。

### 8.1 A 試料（中すう育成用配合飼料）の解析結果

#### 1) 水分

分析値は 228 件の報告があり、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。これらを除いた平均値は 12.14 %で、この 95 %信頼区間は 12.11~12.18 %であった。分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、224 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 9 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 12.15 %、0.28 %及び 2.3 %であった。

その他の方法では、定温乾燥機以外の機器を用いた4件の報告があった。

## 2) 粗たん白質

分析値は237件の報告があり、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。これらを除いた平均値は18.30%で、この95%信頼区間は18.27~18.33%であった。分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法では、19件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは2件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ18.11%、0.42%及び2.3%であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、40件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは2件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ18.21%、0.26%及び1.4%であった。

飼料分析基準・燃焼法では、107件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは4件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ18.40%、0.19%及び1.0%であった。

自動分析機による方法では、70件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは3件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ18.21%、0.20%及び1.1%であった。

## 3) 粗脂肪

分析値は203件の報告があり、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。これらを除いた平均値は4.25%で、この95%信頼区間は4.23~4.27%であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、134件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは6件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ4.29%、0.14%及び3.2%であった。

自動分析機による方法では、69件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは3件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ4.18%、0.13%及び3.2%であった。

## 4) 粗繊維

分析値は147件の報告があり、ロバスト法による $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは6件であった。これらを除いた平均値は3.50%で、この95%信頼区間は3.44~3.56%であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・静置法では、18件の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ3.27%、0.34%及び10.5%であった。

飼料分析基準・ろ過法では、88件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは3件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ3.46%、0.32%及び9.1%であった。

自動分析機による方法では、35件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは1件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ3.81%、0.36%及び9.5%であった。

その他の方法では、自動分析ではない粗繊維測定用機器を用いた方法等の6件の報告があった。

## 5) 粗灰分

分析値は 219 件の報告があり、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。これらを除いた平均値は 6.10 %で、この 95 %信頼区間は 6.09~6.12 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、216 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 6.11 %、0.12 %及び 2.0 %であった。

その他の方法では、自動分析装置による測定等の 3 件の報告があった。

## 6) カルシウム

分析値は 158 件の報告があり、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。これらを除いた平均値は 1.102 %で、この 95 %信頼区間は 1.094~1.109 %であった。

分析法別の解析結果は、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では、29 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 1.142 %、0.072 %及び 6.3 %であった。

飼料分析基準・原子吸光光度法では、125 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 1.094 %、0.043 %及び 4.0 %であった。

その他の方法では、誘導結合プラズマ発光分光分析装置（以下「ICP」という。）による測定、キレート滴定法等の 4 件の報告があった。

## 7) リン

分析値は 166 件の報告があり、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。これらを除いた平均値は 0.884 %で、この 95 %信頼区間は 0.881~0.887 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、162 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 12 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.884 %、0.017 %及び 2.0 %であった。

その他の方法では、ICP による測定、モリブデン青吸光光度法等の 4 件の報告があった。

## 8) サリノマイシンナトリウム

管理分析法では、分析値はサリノマイシンナトリウム無添加試料（未配布）のブランク値による補正が必要であるが、今回は補正されない分析値の報告であるため、飼料分析基準による分析値との間に差が生じる可能性があったことから、これらを分離して集計した。

管理分析法（迅速定量法及びフローインジェクション法）では、分析値は 36 件の報告があり、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 53.5 g(力価)/トンで、この 95 %信頼区間が 52.4~54.5 g(力価)/トンであった。

飼料分析基準（液体クロマトグラフ法及び微生物学的定量法）では、分析値は 46 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは液体クロマトグラフ法による分析値の 1 件であった。これを除いた平均値は 52.8 g(力価)/トンで、この 95 %信頼区間は 52.1~53.6 g(力価)/トンであった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

管理分析法・迅速定量法では、27 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 53.9 g(力価)/トン、3.5 g(力価)/

トン及び6.4%であった。

管理分析法・フローインジェクション法では、9件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは0件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ52.2 g(力価)/トン、2.3 g(力価)/トン及び4.4%であった。

飼料分析基準・液体クロマトグラフ法では、41件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは0件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ53.2 g(力価)/トン、2.7 g(力価)/トン及び5.1%であった。

飼料分析基準・微生物学的定量法では、5件（ロバスト法による $z$ -スコアの算出は行っていない。）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ51.5 g(力価)/トン、2.1 g(力価)/トン及び4.0%であった。

## 8.2 B 試料（魚粉）の解析結果

### 1) 水分

分析値は224件の報告があり、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。これらを除いた平均値は10.48%で、この95%信頼区間は10.45~10.51%であった。分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、220件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは13件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ10.48%、0.20%及び1.9%であった。

その他の方法では、定温乾燥機以外の機器を用いた場合等の4件の報告があった。

### 2) 粗たん白質

分析値は231件の報告があり、ロバスト法による $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは9件であった。これらを除いた平均値は65.26%で、この95%信頼区間は65.16~65.36%であった。分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法では、17件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは1件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ64.47%、0.92%及び1.4%であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、40件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは1件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ64.93%、0.71%及び1.1%であった。

飼料分析基準・燃焼法では、105件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは12件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ65.75%、0.33%及び0.5%であった。

自動分析機による方法では、69件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは7件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ64.88%、0.51%及び0.8%であった。

### 3) 粗灰分

分析値は212件の報告があり、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。これらを除いた平均値は16.55%で、この95%信頼区間は16.54~16.57%であった。分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、209件（うち $z$ -スコアの絶対値が3以上のものは13件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ16.55%、0.10%及び0.6%であった。

その他の方法では、自動分析装置による測定等の 3 件の報告があった。

#### 4) カドミウム

分析値は 49 件の報告があり、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。これらを除いた平均値は 1.29 g/トンで、この 95 %信頼区間は 1.28~1.31 g/トンであった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・溶媒抽出法では、14 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 1.33 g/トン、0.04 g/トン及び 3.4 %であった。

飼料分析基準・簡易法では、32 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 5 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 1.29 g/トン、0.04 g/トン及び 3.3 %であった。

その他の方法では、ICP による測定等の 3 件の報告があった。

#### 5) エトキシキン

分析値は 36 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件であった。これらを除いた平均値は 226.0 g/トンで、この 95 %信頼区間は 220.6~231.5 g/トンであった。

分析値はすべて飼料分析基準による報告であり、その標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 16.2 g/トン及び 7.2 %であった。

### 8.3 D 試料（ほ乳期子豚育成用プレミックス）の解析結果

#### 1) 銅

分析値は 83 件の報告があり、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。これらを除いた平均値は 40.15 g/kg で、この 95 %信頼区間は 39.95~40.35 g/kg であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、81 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 9 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 40.16 g/kg、0.81 g/kg 及び 2.0 %であった。

その他の方法では、ICP による測定等の 2 件の報告があった。

#### 2) 亜鉛

分析値は 76 件の報告があり、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。これらを除いた平均値は 38.19 g/kg で、この 95 %信頼区間は 37.79~38.59 g/kg であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、74 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 4 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 38.22 g/kg、1.71 g/kg 及び 4.5 %であった。

その他の方法では、ICP による測定等の 2 件の報告があった。

#### 3) クエン酸モランテル

分析値は 43 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件であった。これらを除いた平均値は 10.0 g/kg で、この 95 %信頼区間は 9.9~10.1 g/kg であった。

分析値はすべて飼料分析基準による報告であり、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.4

g/kg 及び 3.8 %であった。

#### 8.4 C 試料（鑑定用試料）の鑑定成績

混合した 10 種類の原料の検出とその混合割合の推定を行った。原料混合割合の推定は、15 %以上を多量、5 %以上 15 %未満を中量、1 %以上 5 %未満を少量として報告を求めた。

127 件の報告があり、混合した原料以外に検出と報告があった原料は 27 種類であった。

混合した原料について、とうもろこし（混合割合 34 %）は、127 件（検出率 100 %）の報告があり、原料混合割合の推定の内訳は多量が 123 件、中量が 4 件であった。

大麦（混合割合 18 %）は、115 件（検出率 91 %）の報告があり、その内訳は多量が 81 件、中量が 34 件であった。

玄米（混合割合 3 %）は、81 件（検出率 64 %）の報告があり、その内訳は中量が 60 件、少量が 21 件であった。

コーングルテンミール（混合割合 10 %）は、112 件（検出率 88 %）の報告があり、その内訳は中量が 78 件、少量が 34 件であった。

大豆油かす（混合割合 10 %）は、105 件（検出率 83 %）の報告があり、その内訳は多量が 2 件、中量が 83 件、少量が 20 件であった。

やし油かす（混合割合 10 %）は、76 件（検出率 60 %）の報告があり、その内訳は多量が 3 件、中量が 56 件、少量が 17 件であった。

なたね油かす（混合割合 7 %）は、124 件（検出率 98 %）の報告があり、その内訳は多量が 2 件、中量が 93 件、少量が 29 件であった。

魚粉（混合割合 3 %）は、104 件（検出率 82 %）の報告があり、その内訳は中量が 15 件、少量が 89 件であった。

リン酸カルシウム（配合割合 3 %）は、79 件（検出率 62 %）の報告があり、その内訳は中量が 1 件、少量が 78 件であった。

食塩（混合割合 2 %）は、114 件（検出率 90 %）の報告があり、その内訳は中量が 2 件、少量が 112 件であった。

誤って検出された原料としては、ライ麦が最も多く、74 件の報告があった。次いで、精白米が 37 件、炭酸カルシウムが 32 件と続いた。

## 文 献

- 1) Michael Thompson, Stephen L.R.Ellison, Roger Wood: The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78**(1), 145-196 (2006).



(参考)

## 平成 27 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・飼料添加物製造等業者、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うことにより、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…鑑定用飼料原料混合試料
- 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・・・飼料原料の検出及び混合割合の推定
- 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「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)の別記にある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に準拠してください。

なお、参考までにこれらの分析法の抜粋(飼料分析基準等(抜粋))を添付します。

また、各分析法の末尾に、試料採取量等の一例を記載しましたので、参考として下さい。

- (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)について分析及び鑑定を行い、報告してください。
- (3) B 試料のエトキシキンの分析に用いる標準品は、今回配付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。)
- (4) 共通試料は冷蔵庫に保管し、使用する際には、常温に戻してください。
- (5) 複数の分析法(例えば、粗たん白質におけるケルダール法及び燃焼法)によって分析した場合は、それぞれの分析値を報告してください。

### 5. 分析鑑定成績の報告

- (1) 各分析値及び鑑定結果については、別添の「平成 27 年度飼料等の共通試料による分析鑑定結果報告書」に記入し、報告してください。

(2) 分析値は、水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム及びリンについては%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/トンの単位で表記してください。

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。

分析法及び用いた分析機器等は、備考欄の該当番号に○印を付し、その詳細を報告書様式に従い、記入してください。

また、分析上の特記事項等があれば、その旨も記入してください。

水分について、定温乾燥機を用いて飼料分析基準の条件により測定した場合には、「1. 飼料分析基準」を選択してください。定温乾燥機以外の機器を用いた場合や、定温乾燥機を用いたが、加熱温度、時間が飼料分析基準の条件と異なる場合は、「2. その他の方法」を選択し、用いた機器のメーカー、測定条件等の詳細を記入してください。

なお、クエン酸モランテル、エトキシキン及びサリノマイシンナトリウム（液体クロマトグラフ法）を分析した場合には、標準液及び試料溶液のクロマトグラム各1葉を添付してください。

(3) 鑑定結果は、検出した原料名を報告書(4)の下欄の検出原料名の選択肢から選んで検出原料名欄に記入し、推定される混合割合は、多量(15%以上)、中量(5%以上15%未満)及び少量(1%以上5%未満)の欄に○印を付してください。1%未満と推定される検出物は、検出原料名欄には記入しないでください。なお、C試料には10種類の原料を混合しています。

検出方法は、該当する番号に○印を付してください。(複数回答可)

(4) 分析の一部を別の試験室等で実施した場合は、その試験室名を備考欄に記入してください。

(5) 平成27年9月25日(金)までに報告してください。

(6) 報告書は、所属する飼料品質改善協議会等により下表に従った報告先に送付してください。

表削除

## 平成 27 年度飼料等の共通試料による分析鑑定結果報告書 (様式)

試験室名 \_\_\_\_\_

担当者 \_\_\_\_\_

TEL \_\_\_\_\_

## (1) A 試料 分析結果

試料番号 \_\_\_\_\_

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ( )
粗たん白質	(%)	1. 飼料分析基準 (ケルダール法 (硫酸標準液吸収法) ) 2. 飼料分析基準 (ケルダール法 (ホウ酸溶液吸収法) ) 3. 飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4. 自動分析機 (メーカー) (型式) 5. その他の方法 ( )
粗脂肪	(%)	1. 飼料分析基準 2. 自動分析機 (メーカー) (型式) 3. その他の方法 ( )
粗繊維	(%)	1. 飼料分析基準 (静置法) 2. 飼料分析基準 (ろ過法) 3. 自動分析機 (メーカー) (型式) 4. その他の方法 ( )
粗灰分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ( )
カルシウム	(%)	1. 飼料分析基準 (シュウ酸アンモニウム法) 2. 飼料分析基準 (原子吸光光度法) 3. その他の方法 ( )
リン	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ( )
サリノマイ シンナトリ ウム	(g(カ匁)/トン)	1. 迅速定量法 2. 迅速定量法 (フローインジェクション法) 3. 液体クロマトグラフ法 (g(カ匁)/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 μm) 4. 微生物学的定量法 (g(カ匁)/トン)

## (2) B試料 分析結果

試料番号 \_\_\_\_\_

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ( )
粗たん白質	(%)	1. 飼料分析基準 (ケルダール法 (硫酸標準液吸収法) ) 2. 飼料分析基準 (ケルダール法 (ホウ酸溶液吸収法) ) 3. 飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4. 自動分析装置 (メーカー) (型式) 5. その他の方法 ( )
粗灰分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ( )
カドミウム	(g/ト)	1. 飼料分析基準 (溶媒抽出法) 2. 飼料分析基準 (簡易法) 3. その他の方法 ( )
エトキシキン	(g/ト)	1. 飼料分析基準 測定条件 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 $\mu\text{m}$ ) 2. その他の方法 ( )

## (3) D試料 分析結果

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 $\mu\text{m}$ ) 2. その他の方法 ( )

## (4) C 試料 鑑定結果

試料番号

検出原料名	混合割合	検出方法
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )

多量…15%以上、中量…5%以上 15%未満、少量…1%以上 5%未満

注) 10 種類の原料を混合しています。

---

**検出原料名の選択肢**

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	パイナップルかす	尿素	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等の結果について（平成 27 年度）****Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2015)**

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**

飼料等の使用が原因となって、有害畜産物（家畜等の肉、乳、その他の食用に供される生産物で人の健康をそこなうおそれがあるもの）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見地から、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律<sup>1)</sup>（以下「飼料安全法」という。）第3条第1項の規定に基づき、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令<sup>2)</sup>（以下「成分規格等省令」という。）において、飼料中の有害物質等の成分規格（以下「省令基準値」という。）が定められ、また、飼料の有害物質の指導基準<sup>3)</sup>（以下「指導基準通知」という。）において、飼料中の有害物質等の指導基準値及び管理基準値（以下「指導基準値等」という。）が定められている。

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。）では、飼料分析基準<sup>4)</sup>等に規定された方法を用いて、省令基準値及び指導基準値等の適合状況のモニタリング及び省令基準値、指導基準値等が設定されていない有害物質等の含有実態を把握するためのサーベイランス（以下「モニタリング等」という。）を実施している。今回、平成 27 年度のモニタリング等の結果を取りまとめたので報告する。

**2 方 法****2.1 モニタリング等の対象試料**

平成 27 年 4 月から平成 28 年 3 月までの間に、FAMIC 肥飼料安全検査部、札幌センター、仙台センター、名古屋センター、神戸センター及び福岡センターが、飼料安全法第 57 条の規定に基づき、単体飼料工場、配混合飼料工場、港湾サイロ等に対して立入検査を実施した際に採取した飼料等を対象とした。

モニタリング等の対象とした試料及び点数を表 1 に示した。

**2.2 モニタリング等の対象成分**

以下の成分をモニタリング等の対象とした。なお、各試料に対するモニタリング等実施成分の選定にあたっては、飼料の原産国、過去の検出実態等を勘案するとともに、配混合飼料の対象家畜等、使用されている原料等にも留意した。

**1) 有害物質****i かび毒及びエンドファイト産生毒素（26 成分）****ア 指導基準値等が定められているもの（3 成分）**

とうもろこし及び配混合飼料に指導基準値又は管理基準値が定められているアフラトキシン B<sub>1</sub>、家畜用飼料に管理基準値が定められているゼアラレノン及び家畜等用飼料に管

理基準値が定められているデオキシニバレノールを対象とした。

イ ア以外のかび毒等（23 成分）

飼料分析基準に方法が規定されている以下のかび毒 21 成分及びエンドファイト産生毒素 2 成分を対象とした。

かび毒：アフラトキシン B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, ステリグマトシスチン, HT-2 トキシン, T-2 トキシン, ネオソラニオール, フザレノン-X, 3-アセチルデオキシニバレノール, 15-アセチルデオキシニバレノール, ニバレノール, フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, オクラトキシン A, シトリニン,  $\alpha$ -ゼアララノール,  $\beta$ -ゼアララノール, ゼアララノン,  $\alpha$ -ゼアラレノール及び  $\beta$ -ゼアラレノール

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 重金属等（4 成分）

管理基準値が定められているカドミウム, 鉛, 水銀及びヒ素を対象とした。

iii 農薬（130 成分）

ア 省令基準値が定められているもの

成分規格等省令別表第 1 の 1 の(1)に省令基準値が定められている農薬 60 成分（平成 27 年 11 月末時点。）のうちの 40 成分を対象とした。

イ ア以外農薬

飼料分析基準に方法が規定されている農薬のうちの 90 成分を対象とした。

iv その他の有害物質（4 成分）

管理基準値が定められているメラミンのほか, 指導基準値等は定められていないが, 飼料中に含まれて問題を起こす可能性のある以下の有害物質 3 成分を対象とした。

ア 硝酸態窒素

イ 亜硝酸態窒素

ウ ヒスタミン

2) BSE 発生防止に係る成分

i 動物由来たん白質

成分規格等省令別表第 1 の 2 に規定された牛等を対象とする飼料, 動物由来たん白質又は動物由来たん白質を原料とする飼料中のほ乳動物等由来たん白質を対象とした。

ii 不溶性不純物

成分規格等省令別表第 1 の 5 の(1)に規定された動物性油脂及び特定動物性油脂を対象とした。

3) 病原微生物（サルモネラ）

配混合飼料及び単体飼料を対象とした。

表1 モニタリング等を実施した試料及び点数

モニタリング等の対象試料	項目別の試料点数											
	種 類	試料 点数	有害物質					BSE発生防止に係る試験			病原微生物	
			かび毒	重金属	農薬	メラミン	硝酸態・ 亜硝酸 態窒素	ヒスタミ ン	動物由来たん白質			不溶性 不純物
							顕微鏡 鑑定	ELISA 試験	PCR 試験			
幼すう育成用	5	5	2	3							3	
中すう育成用	2	1	2								1	
大すう育成用	5	2	1	3							2	
成鶏飼育用	51	31	20	32							24	
ブロイラー肥育前期用	9	7	3	3							2	
ブロイラー肥育後期用	21	9	10	9							10	
肉用種鶏飼育用	1	1		1							1	
種鶏飼育用	1	1		1							1	
鶏複数ステージ用	1	1		1							1	
ほ乳期子豚育成用	11	10	4	2							4	
子豚育成用	17	9	9	9							4	
肉豚肥育用	30	23	15	14							14	
種豚育成用	3	1	2	1							2	
種豚飼育用	18	10	10	10							8	
豚複数ステージ用	3	1	1	3							1	
配 混 合 飼 料	ほ乳期子牛育成用代用乳用	4	4	3	3			4			2	
	ほ乳期子牛育成用	6	6	3	3			5	4	4	1	
	若令牛育成用	5	2	3	3			5	5	5	2	
	乳用牛飼育用	48	38	17	21			48	43	43	19	
	幼令肉用牛育成用	4	2	1	4			4	3	3	1	
	肉用牛肥育用	44	19	9	24			44	41	41	14	
	乳肉用牛飼育用	1	1		1			1	1	1		
	肉牛繁殖用	9	3	4	5			9	9	9	3	
	牛複数ステージ用	16	14	7	10			16	12	12	3	
	魚用	16				15		1	1	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)	3	1	2	1			3	3	3	2	
	動物性たん白質混合飼料	10						10	10	10	5	
	フィッシュソリュブル吸着飼料	1						1	1	1		
	糖蜜吸着飼料	1						1	1	1	1	
	上記以外の混合飼料	47	1	1				47	46	46	3	
小 計		395	203	131	167	15		199	180	180	134	
穀 類	とうもろこし	58	58		36							
	マイロ	5	5		5							
	小麦	1	1		1							
	大麦	8	8		8							
	玄米	12	12	12								
	末粉	3	3		3							
	圧ぺん大豆	1	1									
	圧ぺん大麦	2	2		2							
	精白米	1	1		1							
	エクストルーダー処理大豆	1	1		1						1	
	小麦粉	1	1		1							
	きな粉	4	2		2							
小 計		97	95	12	60						1	
そ う こ う 類	米ぬか	2	2		2						1	
	米ぬか油かす	9	8		9						3	
	ふすま	34	27		26						8	
	大豆皮	3	3		3						1	
	ビールかす	2	2		1							
	しょう油かす	1			1							
	麦ぬか	3	1		3						2	
	ホミネーフィード	4	4		1						2	
	とうもろこしジスチラーズグレイソリュブル (DDGS)	14	13		8							
	コーングルテンフィード	21	20		11						2	
小 計		93	80		65						19	



表 1 モニタリング等を実施した試料及び点数（続き）

モニタリング等の対象試料		項目別の試料点数										
種 類	試料 点数	有害物質					BSE発生防止に係る試験			病原微生物		
		かび毒	重金属	農薬	メラミン	硝酸態・ 亜硝酸 態窒素	ヒスタミ 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			
植 物 性 油 か す 類	コーンジャムミール	6	5		5						1	
	濃縮大豆たん白	1	1								1	
	コーングルテンミール	17	16		4						3	
	なたね油かす	25	2		23						4	
	大豆油かす	55	31		42						10	
	あまに油かす	1									1	
	やし油かす	1	1		1							
	ごま油かす	3	3		2						3	
	パーム油かす	1	1		1							
	加糖加熱大豆油かす	1			1							
小 計	111	60		79							23	
動 物 質 性 飼 料	魚粉	83		26		18		10	81	81	81	61
	チキンミール	28		2					28	28	28	20
	フェザーミール	19							19	19	19	7
	豚肉骨粉	2		2					2	2	2	2
	原料混合肉骨粉	24		1					24	24		12
	蒸製骨粉	1							1	1		1
	えび粉末	2							2	2	2	2
	酵素処理魚抽出物	2							2	2	2	2
	魚介類すり身	2							2	2	2	1
	魚醬	1							1	1	1	
小 計	164		31		18			10	135	162	162	108
乾 牧 草	アルファルファ	9		5	8				6			
	チモシー	6		6	6							
	スーダングラス	8		7	8				7			
	バミューダグラス	1		1	1							
	稲わら	1		1								
	ライグラス	2	1	2	2							
	オーツヘイ	6		3	6							
	オーチャードグラス	1		1	1							
	クレイングラス	4		3	4				1			
	ウイートヘイ	3		3	3							
小 計	41	1	32	39				14				
そ の 他	コーンコブミール	1	1		1							
	ビートパルプ	2	2		2							
	綿実	3	3		2							
	飼料用酵母	1							1	1	1	
	キャロブ	1							1	1	1	
	フミン酸	1							1	1	1	
	動物性油脂	75										75
特定動物性油脂	1										1	
小 計	85	6		5					3	3	3	76
合 計	986	445	206	415	33	14	10	337	345	345	76	285

## 2.3 サンプルング方法等

## 1) 有害物質及び病原微生物の分析用試料

試料は、飼料等検査実施要領<sup>5)</sup>により、採取、保管した。とうもろこし及び牧草は、飼料中の農薬の検査に係る通知<sup>6)</sup>により、採取した。

分析用試料は、飼料分析基準第 2 章の規定により調製した。

## 2) 動物由来たん白質等の分析用試料

試料は、飼料分析基準第 16 章第 1 節の規定により、採取、保管及び調製した。

## 3) 不溶性不純物の分析用試料

基準油脂分析試験法<sup>7)</sup>の試料採取方法に準拠した次の方法<sup>8)</sup>により採取した。

動物性油脂を積み込んだ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 箇所から動物性油脂を採取し，これらを混合して試料とした。

## 2.4 試験方法

### 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より実施した。

#### ii 重金属等

飼料分析基準第 4 章第 1 節に規定された方法により実施した。

#### iii 農薬

飼料分析基準第 6 章に規定された方法により実施した。

#### iv メラミン

飼料分析基準第 7 章 7.1 に規定された方法により実施した。

#### v 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より実施した。

#### 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より実施した。

### 2) 飼料への動物由来たん白質等の混入確認

以下の 3 法を併用して実施した。なお，混入確認の結果は，牛を対象とする飼料の抽出検査の取扱いに係る事務連絡<sup>9)</sup>の判定手順（例）（以下「混入確認判定手順」という。）に基づき，総合的に判定した。

#### i 顕微鏡鑑定

飼料分析基準第 19 章 1.1 比重分別及び 1.2 顕微鏡検査を応用した鑑定方法<sup>10)</sup>により，獣骨（肉骨粉由来組織）の有無を確認した。鑑定方法の概要を図 1 に示した。

#### ii ELISA 試験

飼料分析基準第 17 章第 2 節 1.1 の(3)に規定された方法により実施した。

#### iii PCR 試験

魚粉等及び牛用配混合飼料は，飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 に規定された方法により，ほ乳動物由来 DNA を対象に混入の有無を確認した。チキンミール等，ポークミール等及び輸入飼料の一部は，飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.2 に規定された方法により，反すう動物由来 DNA を対象に混入の有無を確認した。なお，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，飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 付記に規定された方法により，乳製品等除去処理を行った後，上記試験を実施した。

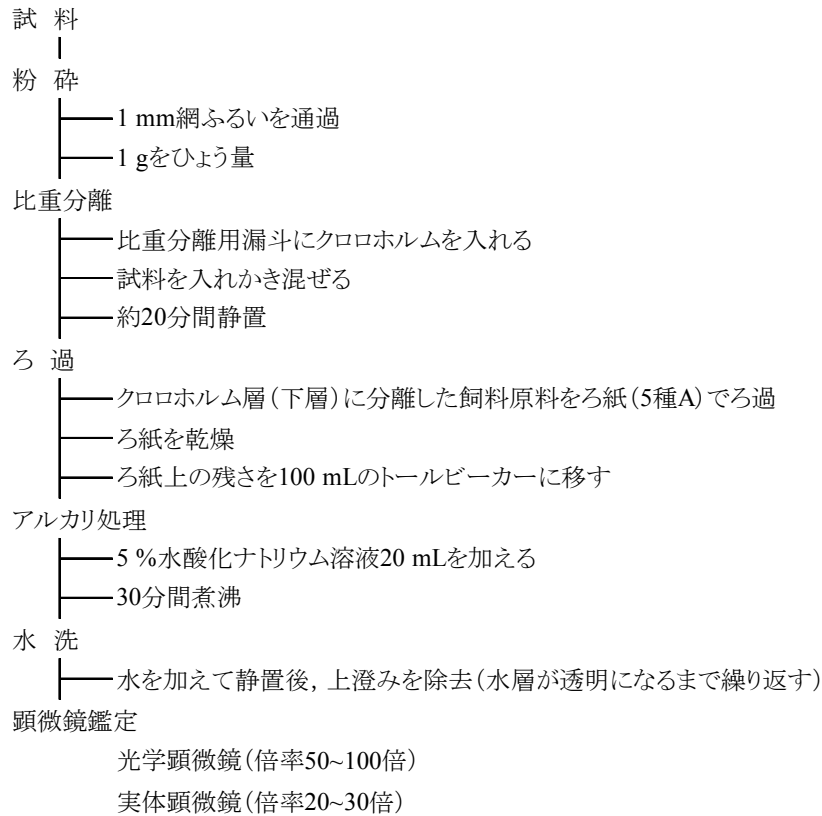


図 1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

## 3) 不溶性不純物

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により実施した。

## 4) サルモネラ

飼料分析基準第 18 章 1 に規定された方法により実施した。なお、分離したサルモネラは、血清型別を実施した。

## 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

配混合飼料 203 点，単体飼料 241 点及び乾牧草 1 点に対し，指導基準値等が定められているアフラトキシン B<sub>1</sub>，ゼアラレノン及びデオキシニバレノールを含む計 26 成分について，のべ 7076 点のモニタリング等を実施した。

指導基準値等が定められている 3 成分のモニタリング等の結果を表 2-1 に，指導基準値等が定められてい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等の結果を表 2-2 に示した。主なかび毒についての結果は，以下のとおりであった。

i アフラトキシン B<sub>1</sub>

配混合飼料 188 点中 15 点から検出され（検出率 8.0 %），検出されたものの最大値は，0.002 mg/kg，平均値は 0.0006 mg/kg であり，指導基準値（乳用牛用 0.01 mg/kg），管理基準値（幼すう用，ブロイラー前期用，ほ乳期子豚用及びほ乳期子牛用は 0.01 mg/kg，それ以外

の配混合飼料は 0.02 mg/kg) を超えるものはなかった。

とうもろこし 58 点中 9 点から検出され (検出率 16 %) , 検出されたものの最大値は 0.003 mg/kg, 平均値は 0.001 mg/kg であり, 管理基準値 (0.02 mg/kg) を超えるものはなかった。

また, とうもろこしの加工副産物計 55 点中 15 点から検出され (検出率 27 %) , 検出されたものの最大値は 0.003 mg/kg, 平均値は 0.0011 mg/kg であった。

#### ii ゼアラレノン

配混合飼料 188 点中 183 点から検出され (検出率 97 %) , 最大値は 0.31 mg/kg, 平均値は 0.045 mg/kg であり, 管理基準値 (家畜用飼料で 1 mg/kg) を超えるものはなかった。

単体飼料の指導基準値等は定められていないが, とうもろこし及びその加工副産物計 113 点中 109 点から検出され (検出率 96 %) , 検出されたものの最大値は 5.6 mg/kg (コーンコブミール) , 平均値は 0.16 mg/kg であった。

#### iii デオキシニバレノール

配混合飼料 188 点中 177 点から検出され (検出率 94 %) , 検出されたものの最大値は 1.5 mg/kg, 平均値は 0.28 mg/kg であり, 管理基準値 (生後 3 ヶ月以上の牛を除く家畜等用飼料は 1 mg/kg, 生後 3 ヶ月以上の牛用飼料は 4 mg/kg) を超えるものはなかった。

単体飼料の指導基準値等は定められていないが, とうもろこし 58 点中 46 点から検出され (検出率 79 %) , 検出されたものの最大値は 0.71 mg/kg, 平均値は 0.32 mg/kg であった。とうもろこしの加工副産物の一部では定量値の高いものがあり, 1 mg/kg を超えて検出されたものは, コーングルテンフィード 12 点 (最大値 5.8 mg/kg) , DDGS 8 点 (最大値 2.1 mg/kg) 及びコーンジャムミール 1 点 (2.8 mg/kg) であった。

上記以外では, 小麦, 小麦粉及び末粉計 5 点中 4 点から検出され, 検出されたものの最大値は 0.60 mg/kg, 平均値は 0.47 mg/kg であった。また小麦の加工副産物であるふすま 27 点中 24 点から検出され (検出率 89 %) , 検出されたものの最大値は 1.5 mg/kg, 平均値は 0.31 mg/kg であった。

表2-1 指導基準値等が定められているかび毒のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象飼料	アフラトキシンB <sub>1</sub> (検出下限 0.0003 mg/kg)						ゼアラレノン (検出下限 0.0003 mg/kg)						デオキシニバレノール (検出下限 0.01 mg/kg)							
	管理/指導基準値 (mg/kg)			うち検出されたもの			管理基準値 (mg/kg)			うち検出されたもの			管理基準値 (mg/kg)			うち検出されたもの				
	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
(アフラトキシンB <sub>1</sub> のみ)配合飼料(乳用牛用)	指 0.01	3	5.9	0.001	0.0007															
配混合飼料(表外 <sup>1)</sup> に示す飼料)	管 0.01	32	2	6.3	0.0005	0.0005	0.0005	1	133	128	96	0.31	0.046	1	117	111	95	0.50	0.22	
配混合飼料(上記以外の配合飼料)	管 0.02	104	10	9.6	0.002	0.0006			54	54	100	0.093	0.041	4	70	65	93	1.5	0.38	
その他の混合飼料	-	1	0						1	1	100	0.096	0.096	-	1	1	100	0.46	0.46	
とうもろこし	管 0.02	58	9	16	0.003	0.001	0.001		58	55	95	0.26	0.039	-	58	46	79	0.71	0.32	
コーングルテンフィード	-	17	5	29	0.002	0.0009			17	16	94	0.41	0.17	-	17	16	94	5.8	2.1	
DDGS	-	13	2	15	0.0007	0.0006			13	13	100	0.29	0.15	-	13	13	100	2.1	1.3	
コーングルテンミール	-	16	5	31	0.003	0.002			16	16	100	0.58	0.26	-	16	13	81	0.22	0.10	
コーンジャムミール	-	4	2	50	0.001	0.0007			4	4	100	0.19	0.13	-	4	3	75	2.8	1.1	
コーンコブミール	-	1	0						1	1	100	5.6	5.6	-	1	1	100	0.09	0.09	
ホムニーフイード	-	4	1	25	0.0004	0.0004			4	4	100	0.23	0.087	-	4	4	100	0.53	0.38	
マイロ	-	5	0						5	5	100	1.1	0.30	-	5	4	80	0.28	0.11	
小麦	-	1	0						1	1	100	0.025	0.025	-	1	1	100	0.23	0.23	
小麦粉	-	1	0						1	1	0			-	1	1	100	0.11	0.11	
米粉	-	3	1	33	0.0006	0.0006			3	1	33	0.017	0.017	-	3	2	67	0.60	0.45	
ふすま	-	27	0						27	18	67	0.028	0.011	-	27	24	89	1.5	0.46	
大麦	-	2	0						8	3	38	0.080	0.040	-	8	6	75	0.05	0.04	
圧べん大麦	-	2	0						2	1	50	0.010	0.010	-	2	2	100	0.45	0.24	
麦ぬか	-	1	0						1	1	100	0.046	0.046	-	1	1	100	0.18	0.18	
ビールかす	-	2	0						2	2	100	0.022	0.016	-	2	2	100	0	0	
圧べん大豆	-	1	0						1	1	0			-	1	1	0	0	0	
エクストルーダー処理大豆	-	1	0						1	1	100	0.080	0.080	-	1	1	0	0	0	
大豆油かす	-	31	5	16	0.0007	0.0004			31	28	90	0.017	0.0058	-	31	6	19	0.05	0.04	
濃縮大豆たん白	-	1	0						1	1	0			-	1	1	0	0	0	
大豆皮	-	3	1	33	0.0004	0.0004			3	3	100	0.040	0.036	-	3	2	67	0.05	0.04	
きなこ	-	2	0						2	2	100	0.012	0.0080	-	2	2	0	0	0	
玄米(新規需要米)	-	12	0						12	10	83	0.033	0.0047	-	12	12	0	0	0	
米ぬか	-	2	0						2	1	50	0.025	0.025	-	2	1	50	0.04	0.04	
米ぬか油かす	-	8	0						8	7	88	0.011	0.0045	-	8	1	13	0.11	0.11	
やし油かす	-	1	1	100	0.013	0.013			1	1	0			-	1	1	0	0	0	
ごま油かす	-	3	0						3	3	100	0.070	0.0060	-	3	3	0	0	0	
パーム油かす	-	1	0						1	1	0			-	1	1	0	0	0	
綿実	-	3	0						3	1	33	0.090	0.0090	-	3	1	33	0.23	0.23	
ピーントールブ	-	2	1	50	0.004	0.004			2	2	100	0.34	0.19	-	2	2	0	0	0	
計		422	48	11					422	382	91				422	326	77			

1) 該当する配混合飼料の種類は以下のとおり。

アフラトキシンB<sub>1</sub>: 幼すう用, プロイラー肥育前期用, ほ乳期子豚用及びほ乳期子牛用

ゼアラレノン: 家畜(豚及び牛)用

デオキシニバレノール: 家畜等(鶏, 豚及び牛(生後3ヶ月以上の牛を除く。))用

表 2-2 指導基準値等が定められていないかび毒及びエンドファイト産生毒素の  
モニタリング等の結果

モニタリング等の対象成分	検出下限 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			
			点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
アフラトキシンB <sub>2</sub>	0.0003	422	5	1.2	0.001	0.0006
アフラトキシンG <sub>1</sub>	0.0003	422	2	0.5	0.006	0.005
アフラトキシンG <sub>2</sub>	0.0003	422	0	0		
ステリグマトシスチン	0.0003	422	114	27	0.043	0.001
HT-2トキシソ	0.005	31	1	3.2	0.007	0.007
T-2トキシソ	0.002	422	92	22	0.26	0.007
ネオソラニオール	0.002	422	5	1.2	0.004	0.003
フザレノン-X	0.02	422	0	0		
3-アセチルデオキシニバレノール	0.003	12	2	17	0.007	0.007
15-アセチルデオキシニバレノール	0.003	12	8	67	0.26	0.10
ニバレノール	0.02	391	20	5.1	4.0	0.27
フモニシンB <sub>1</sub>	0.0006	75	70	93	1.6	0.22
フモニシンB <sub>2</sub>	0.0006	75	65	87	0.54	0.078
フモニシンB <sub>3</sub>	0.0006	75	65	87	0.18	0.031
オクラトキシンA	0.002	19	2	11	0.006	0.004
シトリニン	0.007	12	0	0		
$\alpha$ -ゼアララノール	0.002	422	6	1.4	0.005	0.003
$\beta$ -ゼアララノール	0.002	422	2	0.5	0.007	0.005
ゼアララノン	0.002	422	45	11	0.25	0.010
$\alpha$ -ゼアラレノール	0.003	422	29	6.9	0.12	0.010
$\beta$ -ゼアラレノール	0.003	422	44	10	0.094	0.015
エルゴバリン	0.01	1	1	100	0.016	0.016
ロリトレムB	0.01	1	1	100	0.18	0.18

## 2) 重金属等

鉛及びカドミウムについて、管理基準値の定められている配混合飼料，乾牧草等及び魚粉等（魚粉，チキンミール及び肉骨粉）計 172 点並びに玄米（新規需要米，管理基準値なし。）12 点のモニタリング等を実施した。水銀について、管理基準値の定められている配混合飼料，乾牧草等及び魚粉等計 187 点並びに玄米 12 点のモニタリング等を実施した。また，ひ素について、管理基準値の定められている配混合飼料，乾牧草等及び魚粉等計 55 点のモニタリング等を実施した。その結果を表 3 に示した。

結果の概要は，以下のとおりであった。

### i 鉛

配混合飼料 120 点中 37 点から検出され（検出率 31 %），検出されたものの最大値は 1.9 mg/kg，平均値は 0.6 mg/kg であった。乾牧草等 25 点中 6 点から検出され（検出率 24 %），検出されたものの最大値は 0.4 mg/kg，平均値は 0.2 mg/kg であった。いずれも管理基準値（3 mg/kg）を超えるものはなかった。

動物質性飼料では、魚粉 22 点中 17 点から検出され（検出率 77 %），検出されたものの最大値は 3.4 mg/kg，平均値は 1.0 mg/kg であった。チキンミール 2 点中 1 点から 0.3 mg/kg が，肉骨粉 3 点中 1 点から 0.3 mg/kg がそれぞれ検出された。いずれも，管理基準値（7 mg/kg）を超えるものはなかった。

#### ii カドミウム

配混合飼料 120 点中 64 点から検出され（検出率 53 %），検出されたものの最大値は 0.26 mg/kg，平均値は 0.08 mg/kg であった。乾牧草等 25 点中 16 点から検出され（検出率 64 %），検出されたものの最大値は 0.21 mg/kg，平均値は 0.05 mg/kg であった。いずれも管理基準値（1 mg/kg）を超えるものはなかった。

動物質性飼料では、魚粉では 22 点全てから検出され，最大値は 2.1 mg/kg，平均値は 0.78 mg/kg であった。チキンミールでは 2 点中 1 点から 0.32 mg/kg が検出された。肉骨粉では 3 点中 2 点から検出され（検出率 67 %），検出されたものの最大値は 0.40 mg/kg，平均値は 0.22 mg/kg であった。いずれも管理基準値（3 mg/kg）を超えるものはなかった。

#### iii 水銀

配混合飼料 127 点中 66 点から検出され（検出率 52 %），検出されたものの最大値は 0.08 mg/kg，平均値は 0.03 mg/kg であった。乾牧草 29 点中 23 点から検出され（検出率 79 %）。検出されたものの最大値は 0.08 mg/kg，平均値は 0.03 mg/kg であった。いずれも管理基準値（0.4 mg/kg）を超えるものはなかった。

動物質性飼料では、魚粉では 23 点全てから検出され，最大値は 0.50 mg/kg，平均値は 0.23 mg/kg であった。チキンミールでは 2 点全てから検出され，最大値は 0.03 mg/kg，平均値は 0.02 mg/kg であった。肉骨粉では 3 点全てから検出され，最大値は 0.02 mg/kg，平均値は 0.01 mg/kg であった。いずれも管理基準値（1 mg/kg）を超えるものはなかった。

#### iv ひ素

配混合飼料 30 点中 16 点から検出され（検出率 53 %），検出されたものの最大値は 0.57 mg/kg，平均値は 0.18 mg/kg であった。稲わらを除く乾牧草等では 6 点全てから検出され，最大値は 0.34 mg/kg，平均値は 0.20 mg/kg であった。いずれも管理基準値（2 mg/kg）を超えるものはなかった。

稲わら 1 点からは 2.7 mg/kg が検出され，管理基準値（7 mg/kg）を超えなかった。魚粉では 18 点全てから検出され，最大値は 6.7 mg/kg，平均値は 4.5 mg/kg であり，管理基準値（15 mg/kg）を超えるものはなかった。

表 3 重金属等のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象成分	管理基準値 (mg/kg)	モニタリング等の対象試料	試料点数	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)	平均値 (mg/kg)	
鉛	3	配混合飼料	120	37	31	1.9	0.6	0.2
		乾牧草等	25	6	24	0.4	0.2	
		小計	145	43	30	1.9	0.5	
	7	魚粉	22	17	77	3.4	1.0	
		チキンミール	2	1	50	0.3	0.3	
		肉骨粉	3	1	33	0.3	0.3	
		小計	27	19	70	3.4	0.9	
	—	玄米	12	0	0			
	鉛 計	184	69	38	3.4	0.6		
	カドミウム	1	配混合飼料	120	64	53	0.26	
乾牧草等			25	16	64	0.21	0.05	
小計			145	80	55	0.26	0.07	
3		魚粉	22	22	100	2.1	0.78	
		チキンミール	2	1	50	0.32	0.32	
		肉骨粉	3	2	67	0.40	0.22	
		小計	27	25	93	2.1	0.72	
—		玄米	12	3	25	0.06	0.05	
カドミウム 計		184	108	59	2.1	0.22		
水銀		0.4	配混合飼料	127	66	52	0.08	0.03
	乾牧草等		29	23	79	0.08	0.03	
	小計		156	89	57	0.08	0.03	
	1	魚粉	23	23	100	0.50	0.23	
		チキンミール	2	2	100	0.03	0.02	
		肉骨粉	3	3	100	0.02	0.01	
		小計	28	28	100	0.50	0.19	
	—	玄米	12	6	50	0.02	0.01	
	水 銀 計	196	123	63	0.50	0.07		
	ひ素	2	配混合飼料	30	16	53	0.57	0.18
乾牧草等 (稲わらを除く)			6	6	100	0.34	0.20	
小計			36	22	61	0.57	0.18	
7		稲わら	1	1	100	2.7	2.7	
15		魚粉	18	18	100	6.7	4.5	
ひ 素 計		55	41	75	6.7	2.1		

## 3) 農 薬

飼料等 415 点に対し、省令基準値が定められている 40 成分及び省令基準値が定められていない農薬 90 成分の計 130 成分について、のべ 50248 点のモニタリング等を実施した。その結果を表 4 及び表 5 に示した。

省令基準値を超過したものは、牧草（アルファルファ）中のシハロトリン（基準値 0.6 mg/kg に対して 1.9 mg/kg）1 点であった。

全般に、とうもろこし、麦類及びその加工副産物を中心に有機リン系農薬の検出率が高く、牧草では、検出率は低いものの多種類の農薬が検出された。結果の概要は以下のとおりであった。



## i ピリミホスメチル

省令基準値が定められている穀類 2 種類 41 点について、モニタリング等を実施した結果、とうもろこしは 36 点中 14 点から検出され（検出率 39 %，最大値 1.0 mg/kg），マイロは 5 点中 3 点から検出された（検出率 60 %，最大値 0.29 mg/kg）が、省令基準値を超えるものはなかった。

また、配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 358 点について、モニタリング等を実施した結果、39 点から検出された。その内訳は、大豆油かす 38 点中 2 点（検出率 5 %，最大値 0.063 mg/kg），麦ぬか 3 点中 1 点（検出率 33 %，0.028 mg/kg），ビールかす 1 点中 1 点（0.025 mg/kg），配混合飼料 167 点中 35 点（検出率 21 %，最大値 0.47 mg/kg（ブロイラー肥育前期用））であった。

## ii クロルピリホスメチル

省令基準値が定められている穀類 2 種類 41 点について、モニタリング等を実施した結果、とうもろこしからは検出されなかった。マイロでは 5 点中 1 点から検出された（検出率 20 %，1.6 mg/kg）が、省令基準値を超えるものはなかった。

また、配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 395 点について、モニタリング等を実施した結果、23 点から検出された。その内訳は、ふすま 25 点中 8 点（検出率 32 %，最大値 0.19 mg/kg），配混合飼料 167 点中 15 点（検出率 9 %，最大値 0.39 mg/kg（子豚育成用））であった。

## iii マラチオン

省令基準値が定められている穀類 2 種類 41 点及び牧草 39 点について、モニタリング等を実施した結果、とうもろこし及びマイロからは検出されなかった。牧草では 39 点中 1 点から検出された（検出率 3 %，0.068 mg/kg（スーダングラス））が、省令基準値を超えるものはなかった。

また、配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 319 点について、モニタリング等を実施した結果、8 点から検出された。その内訳は、ふすま 25 点中 7 点（検出率 28 %，最大値 0.23 mg/kg），配混合飼料 167 点中 1 点（検出率 0.6 %，0.044 mg/kg（乳用牛飼育用））であった。

## iv クロルピリホス

省令基準値が定められている穀類 2 種類 41 点及び牧草 39 点について、モニタリング等を実施した結果、とうもろこしは 36 点中 2 点から検出（検出率 6 %，最大値 0.024 mg/kg），マイロは 5 点中 1 点から検出（検出率 20 %，0.090 mg/kg），牧草は 39 点中 1 点から検出された（検出率 3 %，0.13 mg/kg（クレイングラス））が、省令基準値を超えるものはなかった。

また、配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 319 点について、モニタリング等を実施した結果、2 点から検出された。その内訳は、配混合飼料 167 点中 2 点（検出率 1 %，最大値 0.047 mg/kg（肉豚肥育用））であった。

## v その他の検出された農薬

## ① 穀類

フェニトロチオン（とうもろこし），デルタメトリン及びトラロメトリン（とうもろこ

し及びマイロ), ビフェントリン (とうもろこし) 及びシハロトリン (とうもろこし)

② 乾牧草

アトラジン (スーダングラス), クロルタールジメチル (スーダングラス), シハロトリン (アルファルファ及びスーダングラス), ジフェノコナゾール (スーダングラス), ジメトエート (アルファルファ), テブコナゾール (オーツヘイ), トリフルラリン (クレイングラス), ビフェントリン (スーダングラス), プロピコナゾール (ライグラス), ペルメトリン (スーダングラス) 及びペンディメタリン (アルファルファ及びクレイングラス)

③ 原料

グリホサート (大豆油かす), グルホシネート (大豆油かす), ダイアジノン (コーンコブミール), デルタメトリン及びトラロメトリン (ふすま), プロピコナゾール (麦ぬか), ペルメトリン (麦ぬか) 及びメトプレン (ふすま)

④ 配混合飼料

クロルプロファム

表 4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	試料点数	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)		平均値 (mg/kg)
γ-BHC (リンデン)	配混合飼料(鶏・うずら、豚用)	0.05	92	0				
	配混合飼料(牛等用)	0.4	74	0				
	牧草	0.4	39	0			0.005	
	基準値のない飼料	—	205	0				
	計	—	410	0				
BHC	配混合飼料	0.005	166	0				
	牧草	0.02	39	0				
	基準値のない飼料	—	205	0			0.005	
	計	—	410	0				
DDT	配混合飼料	0.1	166	0				
	牧草	0.1	39	0				
	基準値のない飼料	—	205	0			0.02	
	計	—	410	0				
アトラジン	どうもろこし	0.2	36	0				
	マイロ	0.02	5	0				
	牧草	15	39	1	2.6	0.085	0.085	0.02
	基準値のない飼料	—	319	0				
	計	—	399	1	0.3			
アラクロール 平成28年6月18日付で *1: 0.02 mg/kgに改正 *2: 0.05 mg/kgに改正	どうもろこし	0.2 *1	36	0				
	マイロ	0.1 *2	5	0				
	牧草	3 *2	39	0			0.02	
	基準値のない飼料	—	320	0				
	計	—	400	0				
アルドリン及び ディルドリン	配混合飼料	0.02	166	0				
	牧草	0.02	39	0				
	基準値のない飼料	—	205	0			0.02	
	計	—	410	0				
イソフェンホス	どうもろこし	0.02	36	0				
	基準値のない飼料	—	374	0			0.02	
	計	—	410	0				
エチオン	牧草	20	39	0				
	基準値のない飼料	—	371	0			0.02	
	計	—	410	0				
エンドリン	配混合飼料	0.01	166	0				
	牧草	0.01	39	0				
	基準値のない飼料	—	205	0			0.01	
	計	—	410	0				
カルタップ	脱脂ぬか(基準値なし)	—	2	0			0.006	
グリホサート	大豆油かす(基準値なし)	—	12	8	67	2.3	0.96	0.01
グルホシネート	大豆油かす(基準値なし)	—	12	6	50	0.17	0.11	0.02
クロルピリホス	どうもろこし	0.1	36	2	5.6	0.024	0.024	
	マイロ	0.75	5	1	20	0.090	0.090	
	牧草	13	39	1	2.6	0.13	0.13	0.01
	基準値のない飼料	—	319	2	0.6	0.047	0.038	
	計	—	399	6	1.5			
クロルピリホスメチル	どうもろこし	7	36	0				
	マイロ	10	5	1	20	1.6	1.6	
	基準値のない飼料	—	358	23	6.4	0.39	0.096	0.02
	計	—	399	24	6.0			
クロルフェンビンホス	どうもろこし	0.05	36	0				
	基準値のない飼料	—	373	0				0.02
	計	—	409	0				

表4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分，続き）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	試料点数	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)	平均値 (mg/kg)	
クロルプロファム	どうもろこし	0.05	36	0				
	基準値のない飼料	—	363	1	0.3	0.086	0.086	0.02
	計	—	399	1	0.3			
クロルベンジレート	どうもろこし	0.02	36	0				
	基準値のない飼料	—	374	0				0.02
	計	—	410	0				
ジクロルボス及びビナレド	ふすま(基準値なし)	—	1	0				0.007
シハロトリン	どうもろこし	0.04	36	1	2.8	0.021	0.021	
	マイロ	0.2	5	0				
	牧草	0.6	39	2	5.1	1.9	1.1	0.02
	基準値のない飼料	—	319	0				
	計	—	399	3	0.8			
ジメトエート	どうもろこし	1	36	0				
	マイロ	0.2	5	0				
	牧草	2	39	1	2.6	0.37	0.37	0.02
	基準値のない飼料	—	319	0				
	計	—	399	1	0.3			
ダイアジノン	どうもろこし	0.02	36	0				
	マイロ	0.1	5	0				
	牧草	10	39	0				0.02
	基準値のない飼料	—	319	1	0.3	0.53	0.53	
	計	—	399	1	0.3			
デルタメトリン及びトラロメトリン	どうもろこし	1	36	1	2.8	0.073	0.073	0.03
	マイロ	1	5	1	20	0.16	0.16	0.03
	牧草	5	39	0				0.045
	基準値のない飼料	—	319	1	0.3	0.066	0.066	0.03
	計	—	399	3	0.8			
テルブホス	どうもろこし	0.01	36	0				
	マイロ	0.05	5	0				
	牧草	1	39	0				0.005
	基準値のない飼料	—	319	0				
	計	—	399	0				
パラチオン	どうもろこし	0.3	36	0				
	マイロ	0.08	5	0				
	牧草	5	39	0				0.02
	基準値のない飼料	—	319	0				
	計	—	399	0				
ピペロニルブトキシド	ふすま(基準値なし)	—	5	0				0.007
ピリミホスメチル	どうもろこし	1	36	14	39	1.0	0.27	
	マイロ	1	5	3	60	0.29	0.18	0.02
	基準値のない飼料	—	358	39	11	0.47	0.10	
	計	—	399	56	14			
フィプロニル	配混合飼料(鶏・うずら用)	0.01	53	0				
	配混合飼料(牛等、豚用)	0.02	113	0				
	牧草	0.2	39	0				0.003
	基準値のない飼料	—	205	0				
	計	—	410	0				
フェントロチオン	どうもろこし	1	36	3	8.3	0.045	0.038	
	マイロ	1	5	0				
	牧草	10	39	0				0.02
	基準値のない飼料	—	319	0				
	計	—	399	3	0.8			

表 4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分，続き）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	試料点数	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)	平均値 (mg/kg)	
フェンチオン * * 平成27年12月18日 付けで基準値廃止	どうもろこし	5	36	0				
	基準値のない飼料	—	374	0				0.02
	計	—	399	0				
フェントエート	どうもろこし	0.4	36	0				
	マイロ	0.4	5	0				
	基準値のない飼料	—	358	0				0.02
計	—	399	0					
フェンバレレート	配混合飼料(鶏・うずら用)	0.5	53	0				
	配混合飼料(豚用)	4	39	0				
	配混合飼料(牛等用)	8	74	0				
	牧草	13	39	0				
	基準値のない飼料	—	205	0				0.02
計	—	410	0					
フェンプロパトリン	牧草	20	39	0				
	基準値のない飼料	—	371	0				0.02
	計	—	410	0				
ヘプタクロル	配混合飼料	0.02	166	0				
	牧草	0.02	39	0				
	基準値のない飼料	—	205	0				0.02
	計	—	410	0				
ペルメトリン	どうもろこし	2	36	0				
	マイロ	2	5	0				
	牧草	55	39	1	2.6	0.44	0.44	0.02
	基準値のない飼料	—	319	1	0.3	0.13	0.13	
	計	—	399	2	0.5			
ペンディメタリン	どうもろこし	0.2	36	0				
	マイロ	0.1	5	0				
	牧草	15	39	2	5.1	6.3	3.2	0.02
	基準値のない飼料	—	319	0				
	計	—	399	2	0.5			
ホスメット	どうもろこし	0.05	36	0				
	マイロ	0.05	5	0				
	牧草	40	39	0				
	基準値のない飼料	—	319	0				0.02
	計	—	399	0				
ホレート	どうもろこし	0.05	36	0				
	マイロ	0.05	5	0				
	牧草	1.5	39	0				
	基準値のない飼料	—	319	0				0.02
	計	—	399	0				
マラチオン	どうもろこし	2	36	0				
	マイロ	2	5	0				
	牧草	135	39	1	2.6	0.068	0.068	0.02
	基準値のない飼料	—	319	8	2.5	0.23	0.070	
	計	—	399	9	2.3			
メチダチオン	どうもろこし	0.1	36	0				
	マイロ	0.2	5	0				
	牧草	12	39	0				
	基準値のない飼料	—	319	0				0.02
	計	—	399	0				
メトプレン	ふすま(基準値なし)	—	4	1	25	0.022	0.022	0.02

表5 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められていない成分）

モニタリング等の対象成分	うち検出されたもの				うち検出されなかったもの				検出下限 (mg/kg)
	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
EPN	410	0			410	0			0.02
アセトクロール	410	0			410	0			0.02
アニコホス	410	0			410	0			0.02
アメトリン	410	0			410	0			0.02
アリドクロール	410	0			410	0			0.02
アレスリン	410	0			410	0			0.02
イサゾホス	410	0			410	2	0.5 2.4	1.3	0.02
インプロチオラン	410	0			410	0			0.02
イプロベンホス	410	0			410	0			0.02
エタルフルラリン	410	0			410	0			0.02
エデイブエンホス	410	0			410	0			0.02
エトフェンブロックス	410	0			410	0			0.02
エトメセート	410	0			2	0			0.007
エトプロホス	410	0			410	1	0.2 0.037	0.037	0.02
エトリジアゾール	410	0			410	0			0.02
エトリムホス	410	0			410	0			0.02
オキサジアゾン	410	0			410	0			0.02
カズサホス	410	0			410	0			0.02
カルフェントラフェンエチル	410	0			410	0			0.02
キントゼン	410	0			410	5	1.2 0.10	0.048	0.02
クレノキシムメチル	410	0			410	0			0.02
クロルタールジメチル	410	1	0.2 0.041	0.041	410	0			0.02
クロルフェナピル	410	0			410	0			0.02
ジクロホップメチル	410	0			410	0			0.02
ジクロラン	410	0			410	0			0.02
ジフェナミド	410	0			410	0			0.02
ジフェノコナゾール	410	1	0.2 0.13	0.13	410	0			0.02
ジメテナミド	410	0			410	0			0.02
ジメベレート	410	0			410	0			0.02
シラフルオフェン	410	0			410	0			0.02
アラムプロップメチル	410	0			410	0			0.02
フルシトリネート	410	0			410	0			0.02
フルトラニル	410	0			410	0			0.02
フルトリアホール	410	0			410	0			0.02
フルバリネート	410	0			410	0			0.02
フルミオキサジン	410	0			410	0			0.02
フルミクロラックベンチル	410	0			410	0			0.02
フロシミド	410	0			410	0			0.02
フロパクロール	410	0			410	0			0.02
フロパジン	410	0			410	0			0.02
フロパニル	410	0			410	0			0.02
フロバルギット	410	0			410	0			0.02
フロビコナゾール	410	2	0.5 4.7	2.4	410	2	0.5 4.7	2.4	0.02
フロファム	410	0			410	0			0.02
フロフェノホス	410	0			410	0			0.02
フロペタンホス	410	0			410	0			0.02
フロモブチド	410	0			410	0			0.02
フロモプロレート	410	0			410	0			0.02
フロモホス	410	0			410	0			0.02
ヘキサコナゾール	410	0			410	0			0.02
ベノキサコール	410	0			410	0			0.02
ペコナゾール	410	0			410	0			0.02
ペンフルラリン	410	0			410	0			0.02
ホサロン	410	0			410	0			0.02
ホスチアゼート	410	0			410	0			0.02
メタグリホス	410	0			410	0			0.02
メトキシクロル	410	0			410	0			0.02
メノストロピン	410	0			410	0			0.02
メトラクロール	410	0			410	0			0.02
メベンホス	410	0			410	0			0.02

## 4) その他の有害物質

管理基準値が定められているメラミンのほか、指導基準値等は定められていないが、飼料中に多量に含まれると家畜事故を生じるおそれがあることが知られる 3 成分の有害物質について、計 71 点のモニタリング等を実施した。

各成分の結果は、以下のとおりであった。

## i メラミン

養魚用飼料及び魚粉のモニタリング等を実施した結果、養魚用配合飼料は 15 点中 1 点から検出され（検出率 7 %，0.06 mg/kg），魚粉は 18 点中 7 点から検出された（検出率 39 %，最大値 0.16 mg/kg）。いずれも管理基準値（2.5 mg/kg）を超えるものはなかった。

## ii 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

牧草 14 点（アルファルファ 6 点，スーダングラス 7 点，クレイグラス 1 点）のモニタリング等を実施した結果、全ての試料から硝酸態窒素が検出され、最大値は、アルファルファでは 900 mg/kg，スーダングラスでは 660 mg/kg であった。また、1 点の試料から亜硝酸態窒素が検出され（検出率 7 %），アルファルファが 67 mg/kg であった。いずれも輸入の際の品質管理による受入れの目安<sup>11)</sup>（0.1 %）を超えるものはなかった。

## iii ヒスタミン

魚粉のモニタリング等を実施した結果、10 点中 9 点から検出（検出率 90 %，最大値 630 mg/kg）されたが、直ちに家畜事故を生じるおそれが認められるものはなかった。

表 6 その他の有害物質のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象成分	管理基準値 (mg/kg)	モニタリング等の対象試料	試料点数	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)		平均値 (mg/kg)
メラミン	2.5	養魚用配合飼料	15	1	7	0.06	0.06	0.06
		魚粉	18	7	39	0.16	0.12	
		計	33	8	24	0.16	0.11	
硝酸態窒素	—	アルファルファ	6	6	100	900	350	10
		スーダングラス	7	7	100	660	320	
		クレイグラス	1	1	100	46	46	
		計	14	14	100	900	320	
亜硝酸態窒素	—	アルファルファ	6	1	17	67	67	10
		スーダングラス	7	0				
		クレイグラス	1	0				
		計	14	1	7	67	67	
ヒスタミン	—	魚粉	10	9	90	630	250	3

## 3.2 飼料への動物由来たん白質等の混入確認

国内で製造された魚粉 81 点及びその他の魚介類由来たん白質 7 点，並びにチキンミール 28 点及びフェザーミール 19 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった。豚肉骨粉 2 点，原料混合肉骨粉 24 点及び蒸製骨粉 1 点については，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった。なお，ELISA 試験において魚粉 1 点から牛由来たん白質が検出されたが，PCR 試験において同一試料から反すう動物由来 DNA が検出されなかったことから，混入確認判定手順に基づき牛由来たん白質の混入は認められないと総合的に判定した。また，魚粉 1 点から反すう動物

由来 DNA 及び牛由来 DNA が，原料混合肉骨粉 1 点から反すう動物由来 DNA が検出されたが，ELISA 試験において同一試料から牛由来たん白質が検出されなかったことから，混入確認判定手順に基づき牛由来たん白質の混入は認められないと総合的に判定した．これらのモニタリング等の結果を表 7 及び表 8 に示した．

表 7 動物由来たん白質モニタリング等の結果（魚粉等）

	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	81	0	0	81	1	1	81	1	1	1	1	100	0
えび粉末	2	0	0	2	0	0	2	0					0
酵素処理魚抽出物	2	0	0	2	0	0	2	0					0
魚介類すり身	2	0	0	2	0	0	2	0					0
魚醬	1	0	0	1	0	0	1	0					0

\* 反すう動物由来 DNA が検出された試料については，牛由来 DNA の検出確認も実施している．

表 8 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（チキンミール，豚肉骨粉等）

	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DNA			牛由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
チキンミール	28	0	0	28	0	0	28	0	0				0
フェザーミール	19	0	0	19	0	0	19	0	0				0
豚肉骨粉				2	0	0	2	0	0				0
原料混合肉骨粉				24	0	0	24	1	4	1	0	0	0
蒸製骨粉				1	0	0	1	0	0				0

国内で製造されたほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料 4 点，ほ乳期子牛育成用配合飼料 5 点，若令牛育成用配合飼料 5 点，乳用牛飼育用配合飼料 48 点，幼令肉用牛育成用配合飼料 4 点，肉用牛肥育用配合飼料 44 点，乳肉用牛飼育用配合飼料 1 点，肉牛繁殖用配合飼料 9 点，牛数種用配合飼料 16 点，牛用混合飼料 26 点及び糖蜜吸着飼料 1 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった．なお，ELISA 試験において牛用混合飼料 1 点から牛由来たん白質が検出されたが，PCR 試験においてほ乳動物由来 DNA が検出されなかったことから，混入確認判定手順に基づき牛由来たん白質の混入は認められないと総合的に判定した．また，動物由来たん白質を含む混合飼料等 12 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，1 点から反すう動物由来 DNA 及び牛由来 DNA が検出されたが，ELISA 試験において牛由来たん白質が検出されなかったことから，混入確認判定手順に基づき牛由来たん白質の混入は認められないと総合的に判定した．これらのモニタリング等の結果を表 9 に示した．

輸入された牛用混合飼料 24 点，飼料用酵母 1 点，キャロブ 1 点及びフミン酸 1 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった．そのモニタリング等の結果を表 10 に示した．



表 9 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（国内製造牛用飼料等）

	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DNA									
	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)		試料 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	4	0	0										0			
ほ乳期子牛育成用配合飼料	5	0	0	4	0	0	4	0	0				0			
若令牛育成用配合飼料	5	0	0	5	0	0	5	0	0				0			
乳用牛飼育用配合飼料	48	0	0	43	0	0	43	0	0				0			
幼令肉用牛育成用配合飼料	4	0	0	3	0	0	3	0	0				0			
肉用牛肥育用配合飼料	44	0	0	41	0	0	41	0	0				0			
乳肉用牛飼育用配合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0			
肉牛繁殖用配合飼料	9	0	0	9	0	0	9	0	0				0			
牛数種用飼料	16	0	0	12	0	0	12	0	0				0			
その他の混合飼料	26	0	0	25	1	4	25	0	0				0			
糖蜜吸着飼料	1	0	0	1	0	0	1	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	12	0	0	12	0	0				12	1	8	1	1	100	0

\* 反すう動物由来 DNA が検出された試料については、牛由来 DNA の検出確認も実施している。

表 10 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（輸入飼料等）

	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DNA			
	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	
牛用混合飼料										
大韓民国	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
中華人民共和国	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0
台湾	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0
シンガポール	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
インド	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
フランス	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0
イタリア	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
アメリカ合衆国	11	0	0	11	0	0	11	0	0	0
ブラジル	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
飼料用酵母										
アメリカ合衆国	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
キャロブ										
タイ	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
フミン酸										
カナダ	1	0	0	1	0	0	1	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）75 点及び特定動物性油脂 1 点について，不溶性不純物の含有量を測定した結果，不溶性不純物の成分規格を超えるものはなかった。そのモニタリング等の結果を表 11 に示した。

表 11 不溶性不純物のモニタリング等の結果

モニタリング等の 対象試料	成分規格	試料点数	最大値 (%)	平均値 (%)
動物性油脂	0.15 %以下	75	0.14	0.014
特定動物性油脂	0.02 %以下	1	0.012	0.012

### 3.4 サルモネラ

飼料原料 151 点及び配混合飼料 134 点について、サルモネラのモニタリング等を実施した結果、飼料原料 151 点のうち 2 点が陽性（陽性率 1.3 %）であった。なお、前年度及び前々年度の陽性率も、共に 1.3 %であった。区分別にみると、動物質性飼料 108 点中 2 点が陽性（陽性率 1.9 %（前年度 1.6 %，前々年度 0.9 %））であり、植物性油かす類（前年度 0 %，前々年度 5.6 %）及びそうこう類（前年度 0 %，前々年度 0 %）は、全て陰性であった。そのモニタリング等の結果を表 12 に示した。

原産国別としては、国内製造品 148 点中 2 点が陽性（陽性率 1.4 %（前年度 1.4 %，前々年度 0.7 %））であり、輸入品 3 点は全て陰性（陽性率前年度 0 %，前々年度 0 %）であった。そのモニタリング等の結果を表 13 に示した。

配混合飼料は 134 点について全て陰性であった。なお、前年度及び前々年度の陽性率は、それぞれ 0.7 %及び 2.6 %であった。そのモニタリング等の結果を表 14 に示した。

サルモネラ陽性となった魚粉 2 点から分離された各血清型を表 15 に示した。これらの血清型のうち、*S. Senftenberg* については過去 5 年以内に飼料から分離された事例があり、平成 24 年度に配混合飼料 1 点から及び前年度に国内産魚粉 1 点から検出されている。*S. Tennessee* については、過去 5 年以内に飼料から分離された事例はなかった。

なお、病原微生物検出情報<sup>12)</sup>によると、飼料から分離されたこれら 2 種の血清型は、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も分離されており、ここ数年分離された上位 15 血清型に入っていないが、飼料の製造・品質管理におけるサルモネラ対策については、引き続き留意が必要である。

表 12 サルモネラのモニタリング等の結果（飼料原料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試料点数	陽性点数	陽性率 (%)
<b>動物質性飼料</b>			
魚粉	61	2	3.3
チキンミール	20	0	0
フェザーミール	7	0	0
豚肉骨粉	2	0	0
原料混合肉骨粉	12	0	0
蒸製骨粉	1	0	0
えび粉末	2	0	0
酵素処理魚抽出物	2	0	0
魚介類すり身	1	0	0
小 計	108	2	1.9
<b>植物性油かす類</b>			
コーンジャムミール	1	0	0
濃縮大豆たん白	1	0	0
コーングルテンミール	3	0	0
大豆油かす	10	0	0
あまに油かす	1	0	0
なたね油かす	4	0	0
ごま油かす	3	0	0
小 計	23	0	0
<b>そうこう類</b>			
米ぬか	1	0	0
米ぬか油かす	3	0	0
ふすま	8	0	0
大豆皮	1	0	0
麦ぬか	2	0	0
ホミニーフード	2	0	0
コーングルテンフィード	2	0	0
小 計	19	0	0
<b>穀 類</b>			
エクストルーダー処理大豆	1	0	0
小 計	1	0	0
合 計	151	2	1.3

表 13 サルモネラのモニタリング等の結果（原産国及び飼料原料の種類別）

原産国	動物質性飼料		植物性油かす類		その他		合計 (陽性率)
	魚粉	その他	大豆 油かす	その他	そうこ う類	その他	
国産 (陽性率)	2/60 (3.3%)	0/47 (0%)	0/9 (0%)	0/12 (0%)	0/19 (0%)	0/1 (0%)	2/148 (1.4%)
輸入							
デンマーク			0/1				0/1 (0%)
オランダ				0/1			0/1 (0%)
ペルー	0/1						0/1 (0%)
小 計 (陽性率)	0/1 (0%)		0/1 (0%)	0/1 (0%)			0/3 (0%)
合 計 (陽性率)	2/61 (3.3%)	0/47 (0%)	0/10 (0%)	0/13 (0%)	0/19 (0%)	0/1 (0%)	2/151 (1.3%)

表 14 サルモネラのモニタリング等の結果（配混合飼料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試料点数	陽性点数	陽性率 (%)
鶏用配合飼料	45	0	0
豚用配合飼料	33	0	0
牛用配合飼料	45	0	0
動物質性たん白質混合飼料	5	0	0
その他の混合飼料	6	0	0
合 計	134	0	0

表 15 陽性試料から検出されたサルモネラの血清型

血清型	検出された飼料の種類
	魚粉 (2点中)
<i>S. Tennessee</i>	1
<i>S. Senftenberg</i>	1
合 計	2

## 文 献

- 1) 法律：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 (1953).
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，省令第 35 号 (1976).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：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).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) 農林省畜産局長通知：飼料等検査実施要領の制定について，昭和 52 年 5 月 10 日，52 畜 B 第 793 号 (1977).
- 6) 農林水産省消費・安全局畜産安全管理課長通知：飼料中の農薬の検査について，平成 18 年 5 月 26 日，18 消安第 2322 号 (2006).
- 7) 日本油化学会規格試験法委員会編：2.1.1 試料採取方法，基準油脂分析試験法 2013 年版，日本油化学会 (2013) (ISBN: 9784931249066).
- 8) 泉 和夫，石橋 隆幸，青山 幸二，石黒 瑛一：飼料研究報告，27，233 (2002).
- 9) 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：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 (2002).
- 10) 農林水産省生産局長通知：反すう動物用飼料への反すう動物等由来たん白質の混入防止に関するガイドラインの制定について，平成 13 年 6 月 1 日，13 生畜第 1366 号 (2001).
- 11) 農林水産省消費・安全局畜産安全管理課長：輸入乾牧草の安全性確保について，平成 19 年 5 月 7 日，19 消安第 1297 号 (2007).
- 12) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr.html>, cited 1 July 2016.

## 調査資料

## 2 飼料中のダイオキシン類のモニタリング結果について（平成 23~27 年度）

加藤 耕一<sup>\*1</sup>, 山本 謙吾<sup>\*2</sup>, 青山 幸二<sup>\*3</sup>

## Monitoring Results of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in Feeds (in the fiscal 2011~2015)

Koichi KATO<sup>\*1</sup>, Kengo YAMAMOTO<sup>\*2</sup> and Koji AOYAMA<sup>\*3</sup>

(<sup>\*1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department,  
(Now Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan),

<sup>\*2</sup>Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department  
(Now Food Labeling Monitoring Department),

<sup>\*3</sup>Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

The contamination of dioxins (polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and coplanar polychlorinated biphenyls (Co-PCBs)) in feeds of animal by-product was investigated. From fiscal year 2011 to 2015, 50 fish meal samples, 25 fish oil samples, and 50 animal fats and oils samples were collected from the Japanese feed production industry. These samples were digested with 2 mol/L potassium hydroxide ethanol solution, and dioxins were extracted with hexane. These extracts were purified with Multi-Layered Dioxin Tube (Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA). The effluents were purified and separated into mono-*ortho* Co-PCBs fraction and PCDDs + PCDFs + non-*ortho* Co-PCBs fraction with active carbon-dispersed silica gel reversible column (Kanto Chemical, Tokyo, JAPAN). Dioxins in each fraction were analyzed by a high resolution GC-MS, and then toxic equivalent quantities (TEQ) of PCDDs + PCDFs, Co-PCBs and the total value were calculated. The TEQ levels of dioxins in feed samples were in the range of 0.009~2.7 ng-TEQ/kg for fish meal, 0.74~23 ng-TEQ/kg for fish oil, 0.004~0.47 ng-TEQ/kg for animal fats and oils, respectively. The congener profile in samples of fish meal, fish oil, animal fats and oils suggested that the total TEQ was derived mainly from non-*ortho* Co-PCBs, which accounted for 75~100 % of the total TEQ.

Key words: dioxin; polychlorinated dibenzo-*para*-dioxin (PCDD); polychlorinated dibenzofuran (PCDF); coplanar polychlorinated biphenyl (Co-PCB); feed; fish meal; fish oil; animal fats and oils; TEQ (2,3,7,8-TeCDD Toxicity Equivalent Quantity)

キーワード：ダイオキシン；ポリ塩化ジベンゾ - パラ - ジオキシン；ポリ塩化ジベンゾフラン；コプラナーポリ塩化ビフェニル；飼料；魚粉；魚油；動物性油脂；毒性当量

\*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肥飼料安全検査部，現 表示監視部

\*3 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

独立行政法人農林水産消費安全技術センターは、「ダイオキシン対策推進基本指針」(平成 11 年 3 月ダイオキシン対策関係閣僚会議決定)及び「食品の安全性に関する有害化学物質サーベイランス・モニタリング中期計画」(平成 22 年 12 月 22 日農林水産省公表. 以下「中期計画」という.)に基づき、飼料中のダイオキシン類(ポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン(以下「PCDDs」という.),ポリ塩化ジベンゾフラン(以下「PCDFs」という.)及びコプラナーポリ塩化ビフェニル(以下「Co-PCBs」という.))のモニタリング調査を平成 12 年度から実施し、各飼料の毒性当量(以下「TEQ」という.)について順次報告してきた<sup>1)</sup>。

今回、中期計画期間(平成 23~27 年度)のモニタリング結果について、飼料の種類別に取りまとめたので概要を報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

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、札幌センター、仙台センター、名古屋センター、神戸センター及び福岡センターにおいて飼料原料工場、配合飼料工場、港湾倉庫等から採取した魚粉(50 検体)、魚油(25 検体)及び動物性油脂(50 検体)を供試試料とした。試料の採取方法は、飼料等検査実施要領<sup>2)</sup>に準拠した。

分析用試料の調製及び保管方法は、飼料分析基準<sup>3)</sup>第 2 章の規定に準拠した。

なお、魚油及び動物性油脂については 70 °C に加温して融解し、よく混合したものを供試試料とした。

### 2.2 方 法

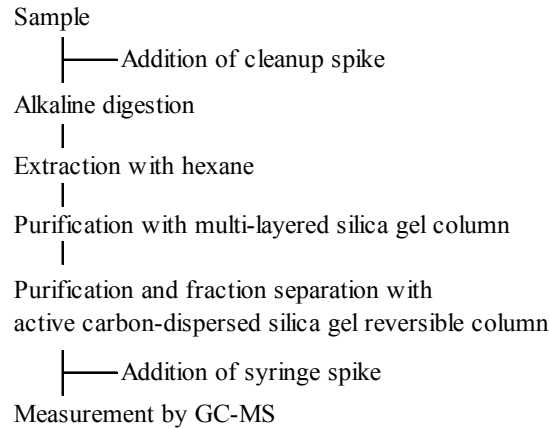
ダイオキシン類の測定方法並びに各異性体の定量及び毒性当量への換算は、飼料中のダイオキシン類の定量法暫定ガイドライン<sup>4)</sup>に準拠した。

また、分析法の概要を Scheme 1 に示した。

なお、定量下限値については Table 1 のとおりであり、飼料中の異性体の濃度が定量下限値未満の場合、その異性体の毒性当量を 0 として扱った。

Table 1 Target lower limit of quantification of dioxins in feeds

PCDDs and PCDFs			Co-PCBs	
Tetra- and pentachlorides	Hexa- and heptachlorides	Octachlorides	Non-ortho	Mono-ortho
0.05 ng/kg	0.1 ng/kg	0.2 ng/kg	0.5 ng/kg	1 ng/kg



Scheme 1 Analytical procedure for dioxins in feed

### 3 結果

#### 3.1 飼料の総毒性当量

平成 23~27 年度の飼料原料の種類別の毒性当量を Table 2 に示した。

魚粉 50 検体中のダイオキシン類の総毒性当量は、平均値が 0.91 ng-TEQ/kg（最小 0.009~最大 2.7 ng-TEQ/kg）であった。

魚油 25 検体中のダイオキシン類の総毒性当量は、平均値が 9.9 ng-TEQ/kg（最小 0.74~最大 23 ng-TEQ/kg）であった。

動物性油脂 50 検体中のダイオキシン類の総毒性当量は、平均値が 0.09 ng-TEQ/kg（最小 0.004~最大 0.47 ng-TEQ/kg）であった。

#### 3.2 総毒性当量における PCDDs, PCDFs 及び Co-PCBs の占める割合

モニタリングした魚粉（50 検体）、魚油（25 検体）及び動物性油脂（50 検体）について、各総毒性当量における PCDDs, PCDFs 及び Co-PCBs の毒性当量の占める割合を算出した。

飼料の種類別に PCDDs, PCDFs 及び Co-PCBs の平均毒性当量を求め、これらの平均毒性当量が総平均毒性当量に占める割合を算出した。

その結果、Fig. 1 のとおり、魚粉、魚油及び動物性油脂のノンオルト体 Co-PCBs の毒性当量は、各総毒性当量の 75~100 % と最も大きな割合を占めた。

Table 2 Contaminations of dioxins in feeds

Feed types	Year	<i>n</i> <sup>a)</sup>	TEQ value of PCDDs+PCDFs (ng-TEQ/kg)			TEQ value of Co-PCBs (ng-TEQ/kg)			Total TEQ value (ng-TEQ/kg)		
			Max. <sup>b)</sup>	Min. <sup>b)</sup>	Mean <sup>b)</sup>	Max. <sup>b)</sup>	Min. <sup>b)</sup>	Mean <sup>b)</sup>	Max. <sup>b)</sup>	Min. <sup>b)</sup>	Mean <sup>b)</sup>
			Fish meal	2011	10	0.33	0	0.15	1.2	0.009	0.37
	2012	10	0.69	0.007	0.20	2.0	0.12	0.87	2.7	0.13	1.1
	2013	10	0.68	0	0.21	1.8	0.07	0.69	2.5	0.07	0.89
	2014	10	0.72	0.03	0.27	2.0	0.10	0.92	2.6	0.16	1.2
	2015	10	0.44	0.01	0.20	1.5	0.14	0.66	1.9	0.15	0.86
Fish oil	2011	5	5.7	0.13	3.2	9.0	0.62	6.5	14	0.74	9.7
	2012	5	4.9	0.81	1.9	12	5.1	8.3	17	6.6	10
	2013	5	4.7	1.1	2.8	12	4.5	8.1	17	5.6	11
	2014	5	4.1	1.0	2.3	19	4.2	9.0	23	5.2	12
	2015	5	4.2	0.32	1.4	9.3	2.8	5.7	14	3.1	7.2
Animal fats and oils	2011	10	0.34	0.005	0.10	0.10	0.0004	0.04	0.43	0.005	0.14
	2012	10	0.17	0.005	0.06	0.11	0.0004	0.03	0.21	0.006	0.09
	2013	10	0.14	0.004	0.06	0.003	0.00008	0.0008	0.14	0.004	0.06
	2014	10	0.37	0.005	0.07	0.16	0	0.03	0.47	0.005	0.10
	2015	10	0.16	0.007	0.07	0.07	0.0002	0.01	0.16	0.007	0.08

a) Number of samples

b) Max.; Maximum TEQ value, Min.; Minimum TEQ value, Mean; Mean TEQ value

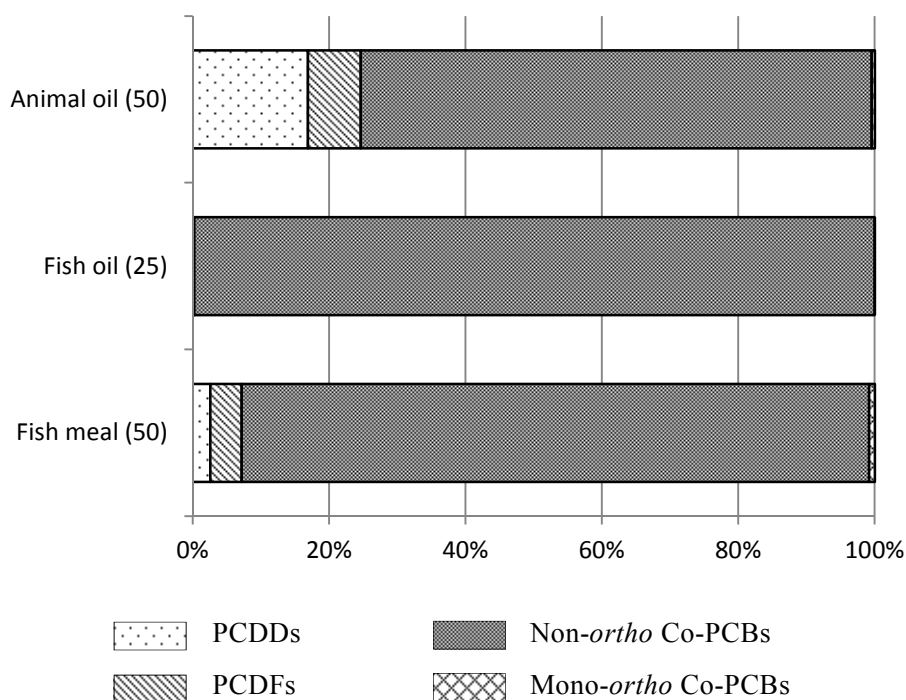


Fig. 1 Contributions of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs to the total TEQ in feeds of animal by-product

Contribution percentages are calculated with averaged TEQ values for each feedstuff type. Numbers of each feed sample are shown in the parenthesis.



#### 4 まとめ

平成 23~27 年度の飼料中のダイオキシン類のモニタリング結果は、次のとおりであった。

- 1) 魚粉の毒性当量は 0.009~2.7 ng-TEQ/kg であった。
- 2) 魚油の毒性当量は 0.74~23 ng-TEQ/kg であった。
- 3) 動物性油脂の毒性当量は 0.004~0.47 ng-TEQ/kg であった。
- 4) 魚粉，魚油及び動物性油脂のノンオルト体 Co-PCBs の毒性当量は，各総毒性当量の 75~100 % と最も大きな割合を占めた。

#### 文 献

- 1) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：モニタリング試験結果の公表，[http://www.famic.go.jp/ffis/feed/sub4\\_monitoring.html](http://www.famic.go.jp/ffis/feed/sub4_monitoring.html), cited 22 Apr. 2016.
- 2) 農林省畜産局長通知：飼料等検査実施要領の制定について，昭和 52 年 5 月 10 日，52 畜 B 第 793 号 (1977).
- 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 (2009).
- 4) 農林水産省消費・安全局衛生管理課長通知：飼料中のダイオキシン類の定量法暫定ガイドラインの全面改訂について，16 消安第 5299 号，平成 16 年 11 月 24 日 (2004).

## 調査資料

## 2 特定添加物検定結果等について（平成 27 年度）

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課

## Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2015)

特定添加物とは、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 年法律第 35 号．以下「飼料安全法」という．）第 3 条第 1 項の規定に基づき規格が定められた飼料添加物のうち、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．特定添加物は、飼料安全法第 5 条第 1 項の規定により、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．）が行う検定を受け、検定合格証紙が付されたものでなければ販売してはならないこととされている．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（以下「登録特定飼料等製造業者」という．）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については、この限りではない．

平成 27 年度に FAMIC に対して検定の申請があり、これに合格した特定添加物について、結果をとりまとめたのでその概要を報告する．また、平成 27 年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等についても併せて報告する．なお、平成 27 年度末の時点で、外国特定飼料等製造業者の登録はない．

## 1 特定添加物の検定申請業者及び品名等

平成 27 年度に検定に合格した特定添加物について、その種類及び品名等を申請業者別に表 1 に示した．

申請は 9 業者からあり（前年度 8 業者）、その製造形態等は、①輸入した製造用原体を用いて製剤の製造のみを行っているのが 2 業者、②製造用原体の製造及び製剤の製造を行っているのが 1 業者、③製造用原体を用いた製剤の製造及び製剤の小分け製造を行っているのが 1 業者、④製剤の輸入のみを行っているのが 4 業者、⑤輸入した製造用原体を用いた製剤製造及び製剤の輸入を行っているのが 1 業者であった．

平成 27 年度に検定に合格した特定添加物は 12 種類、20 銘柄であり（前年度 11 種類、19 銘柄）、ノシヘプタイド（飼料級）以外は全て、製造用原体又は製剤の製造を海外に依存していた．

製造用原体又は製剤の輸入先国は、①亜鉛バシトラシン（製剤）、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）、エンラマイシン（製造用原体）、ノシヘプタイド（製造用原体）及び硫酸コリスチン（製造用原体）が中国、②アピラマイシン（製剤）が英国、③クロルテトラサイクリン（製剤）がシンガポール、④ナラシン（製剤）及びリン酸タイロシン（製剤）が米国、⑤フラボフォスフォリポール（製剤）及びモネンシンナトリウム（製造用原体）がブルガリア、⑥サリノマイシンナトリウム（製造用原体）が中国及びブルガリア、⑦硫酸コリスチン（製剤）が韓国で、6 カ国（前年度 5 カ国）であった．

表 1 検定申請業者及び品名等一覧  
（平成 27 年度）

管 区 <sup>※1</sup>	申 請 業 者 名	製造事業場名	特 定 添 加 物 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	株式会社ティエスピー <sup>※2</sup>	-	クロルテトラサイクリン	○	CTC F-100	100	
	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	
	日本ニュートリション株式会社	鹿島工場	サリノマイシンナトリウム	○	サコックス100	100	
	ミヤリサン製薬株式会社 <sup>※2</sup>	-	フラボフォスフォリポール	○	フラボマイシン80	80	
	ロック化学製品株式会社	御殿場工場	エンラマイシン	○	エンラマイシン8%R	80	
			サリノマイシンナトリウム	○	サリノ10%R-K	100	
			硫酸コリスチン		硫酸コリスチン10%R	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	
			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 <sup>※2</sup>	-	アピラマイシン	○	サーマックス200	200	
			ナラシン	○	モンデパン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	○	ノシヘプタイド40	40	
				○	ノシフィード40	40	
	ゾエティス・ジャパン株式会社 <sup>※2</sup>	-	亜鉛バシトラシン	○	アエンバシトラシン100FA	100	4,200単位/g
日本ニュートリション株式会社 <sup>※2</sup>	-	硫酸コリスチン		硫酸コリスチン10%	100		
計	9業者	11事業場	12種類		20銘柄		

※1 本部管区：関東・甲信越・静岡、札幌管区：北海道、仙台管区：東北、名古屋管区：北陸・東海（静岡除く）、神戸管区：近畿・中国（山口除く）・四国、福岡管区：山口・九州・沖縄

※2 輸入業者に該当

## 2 特定添加物の種類別の検定合格件数等

平成 27 年度の特定添加物の種類別の検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量を平成 25 年度及び平成 26 年度の結果とともに表 2 に示した。なお、セデカマイシンは、平成 26 年 2 月 6 日付けで飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年 7 月 24 日農林省令第 35 号）が改正され、飼料添加物としての指定が取り消されている。

平成 27 年度の検定合格件数は 181 件、合格数量は 786 トンで実量力価換算量は 88 トン（力価）であった。件数、数量及び実量力価換算量の対前年度比は、それぞれ 100.6 %、86.5 %、84.5 % となり、件数はわずかに増加したが、数量及び実量力価換算量は減少した。

平成 27 年度の検定合格数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウムが全体の 36.7 %（前年度 26.9 %）で最も多く、次いで硫酸コリスチン 28.5 %（前年度 17.4 %）、ナラシンが 16.7%（前年度 34.9 %）、アピラマイシンが 8.0 %（前年度 10.1 %）、ノシヘプタイドが 2.8 %（前年度 1.3 %）となった。また、実量力価換算量では、サリノマイシンナトリウムが全体の 32.6 %（前年度 23.4 %）で最も多く、次いで硫酸コリスチンが 25.3 %（前年度 15.1 %）、ナラシンが 14.9 %（前年度 30.3 %）、アピラマイシンが 14.2 %（前年度 17.5 %）、リン酸タイロシンが 6.2 %（前年度 5.1 %）となった。

平成 27 年度の検定合格数量及び実量力価換算量を前年度と比較すると、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、エンラマイシン、クロルテトラサイクリン、サリノマイシンナトリウム、ノシヘプタイド、硫酸コリスチン及びリン酸タイロシンは増加し、一方、亜鉛バシトラシン、アピラマイシン、ナラシン及びモネンシンナトリウムは減少した。また、前年度検定の申請がなかったフラボフォスフォリポールは実績があった。

ラサロドナトリウムは平成 22 年度から、バージニアマイシンは平成 20 年度から、センデュラマイシンナトリウムは平成 19 年度から、エフロトマイシンは平成 17 年度から、ピコザマイシンは平成 11 年度から検定の申請がなく、これらは平成 27 年度も申請がなかった。なお、ラサロ

シドナトリウムは、後述の表5に示したとおり、登録特定飼料等製造業者による製造実績があった。

表2 検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量（種類別）  
（平成25年度～平成27年度）

類別	特定添加物の種類	平成25年度					平成26年度					平成27年度				
		合格件数(件)	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(件)	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(件)	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	亜鉛バシトリン	8	44,920	4.9	5,241	4.9	7	34,780	3.8	3,727	3.6	2	9,500	1.2	950	1.1
	エンラマイシン	—	—	—	—	—	2	2,380	0.3	190	0.2	3	3,720	0.5	298	0.3
	ノシヘプタイド	—	—	—	—	—	3	12,000	1.3	480	0.5	6	22,000	2.8	880	1.0
	硫酸コリスチン	56	220,320	23.9	22,032	20.5	41	158,120	17.4	15,812	15.1	58	223,820	28.5	22,382	25.3
	小計	64	265,240	28.8	27,273	25.3	53	207,280	22.8	20,209	19.3	69	259,040	32.9	24,510	27.7
テトラサイクリン系	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	—	—	—	—	—	1	2,000	0.2	800	0.8	1	3,000	0.4	1,200	1.4
	クロルテトラサイクリン	4	16,000	1.7	1,600	1.5	3	14,400	1.6	1,440	1.4	3	14,000	1.8	1,400	1.6
	小計	4	16,000	1.7	1,600	1.5	4	16,400	1.8	2,240	2.1	4	17,000	2.2	2,600	2.9
マクロライド系	セデカマイシン※	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	リン酸タイロシン	4	20,262	2.2	5,572	5.2	5	19,370	2.1	5,327	5.1	4	19,994	2.5	5,498	6.2
小計	4	20,262	2.2	5,572	5.2	5	19,370	2.1	5,327	5.1	4	19,994	2.5	5,498	6.2	
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリボル	1	2,500	0.3	200	0.2	—	—	—	—	—	1	1,250	0.2	100	0.1
	小計	1	2,500	0.3	200	0.2	—	—	—	—	—	1	1,250	0.2	100	0.1
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	76	308,122	33.4	30,812	28.6	61	244,875	26.9	24,488	23.4	71	288,780	36.7	28,878	32.6
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ナラシン	18	197,625	21.4	19,763	18.4	29	317,775	34.9	31,778	30.3	12	131,625	16.7	13,163	14.9
	モネンシンナトリウム	2	7,940	0.9	1,588	1.5	3	12,140	1.3	2,428	2.3	3	6,080	0.8	1,216	1.4
	ラサロシドナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
小計	96	513,687	55.7	52,163	48.5	93	574,790	63.2	58,693	56.0	86	426,485	54.2	43,257	48.9	
その他	アピラマイシン	28	104,200	11.3	20,840	19.4	25	91,575	10.1	18,315	17.5	17	62,675	8.0	12,535	14.2
	エフロトマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	バージニアマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ピコザマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	小計	28	104,200	11.3	20,840	19.4	25	91,575	10.1	18,315	17.5	17	62,675	8.0	12,535	14.2
総計	197	921,889	100.0	107,648	100.0	180	909,415	100.0	104,784	100.0	181	786,444	100.0	88,499	100.0	
対前年度比(%)	103.7	96.6	99.2	99.2	91.4	98.6	97.3	100.6	86.5	84.5						

—:実績なし

※ セデカマイシンは、平成27年2月6日付けで飼料添加物としての指定が取り消された。

### 3 特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数等

特定添加物は、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及び精製した高純度の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製造用原体に由来するものである。

平成27年度の特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量を表3に示した。

精製級と飼料級の割合を比較すると、飼料級が検定合格件数全体の61.3%（前年度72.2%）、検定合格数量全体の65.8%（前年度78.9%）、実量力価換算量全体の65.0%（前年度76.7%）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、精製級と飼料級の両規格が設定されているが、平成27年度は、硫酸コリスチンは精製級のみ、サリノマイシンナトリウムは飼料級のみ検定の実績があった。

表 3 検定合格件数，合格数量及び実量力価換算量（精製級・飼料級別）  
（平成 27 年度）

類 別	特 定 添 加 物 の 種 類	精 製 級 <sup>※</sup>			飼 料 級 <sup>※</sup>		
		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	亜鉛バシトリン				2	9,500	950
	エンラマイシン				3	3,720	298
	ゾシヘプタイド	4	16,000	640	2	6,000	240
	硫酸コリスチン	58	223,820	22,382	—	—	—
テトラサイクリン系	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	1	3,000	1,200			
	クロルテトラサイクリン				3	14,000	1,400
マクロライド系	リン酸タイロシン	4	19,994	5,498			
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリポール				1	1,250	100
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	—	—	—	71	288,780	28,878
	センデュラマイシンナトリウム						
	ナラシン				12	131,625	13,163
	モネンシンナトリウム	3	6,080	1,216			
	ラサロシドナトリウム	—	—	—			
その他	アピラマイシン				17	62,675	12,535
	エフロマイシン	—	—	—			
	バージニアマイシン	—	—	—			
	ピコザマイシン	—	—	—			
合 計		70	268,894	30,936	111	517,550	57,563
割 合 (%)		38.7	34.2	35.0	61.3	65.8	65.0

—:実績なし

※ 斜線は、当該区分の規格がないことを示す。

#### 4 特定添加物の類別の検定合格数量等の推移

平成 18 年度から平成 27 年度までの過去 10 年間における特定添加物の類別の検定合格数量及び実量力価換算量の推移をそれぞれ図 1 及び図 2 に示した。

検定合格数量全体では、平成 21 年度に一部銘柄において登録特定飼料等製造業者による製造へ移行した影響で大幅な減少が見られたが、それ以降はほぼ横ばいで推移し、平成 27 年度は若干減少した。また、実量力価換算量についても同様の傾向であった。

特定添加物の検定合格数量を類別にみると、いずれの年度もポリエーテル系が最も多く、平成 18 年度から平成 21 年度までは全体の 50 %以上を占める割合で推移し、平成 22 年度に 50 %を切ったものの、平成 23 年度以降も 50 %を超える割合を維持している。平成 27 年度は、ポリエーテル系が全体の 54 %（前年度 63 %），次いでポリペプチド系が 33 %（前年度 23 %）を占めた。

また、実量力価換算量でも同様にポリエーテル系が最も多く、平成 18 年度から平成 20 年度までは全体の 60 %前後で推移しており、平成 21 年度以降も 40 %を超える割合を維持している。平成 27 年度は、ポリエーテル系が 49 %（前年度 56 %），次いでポリペプチド系が 28 %（前年度 19 %）を占めた。

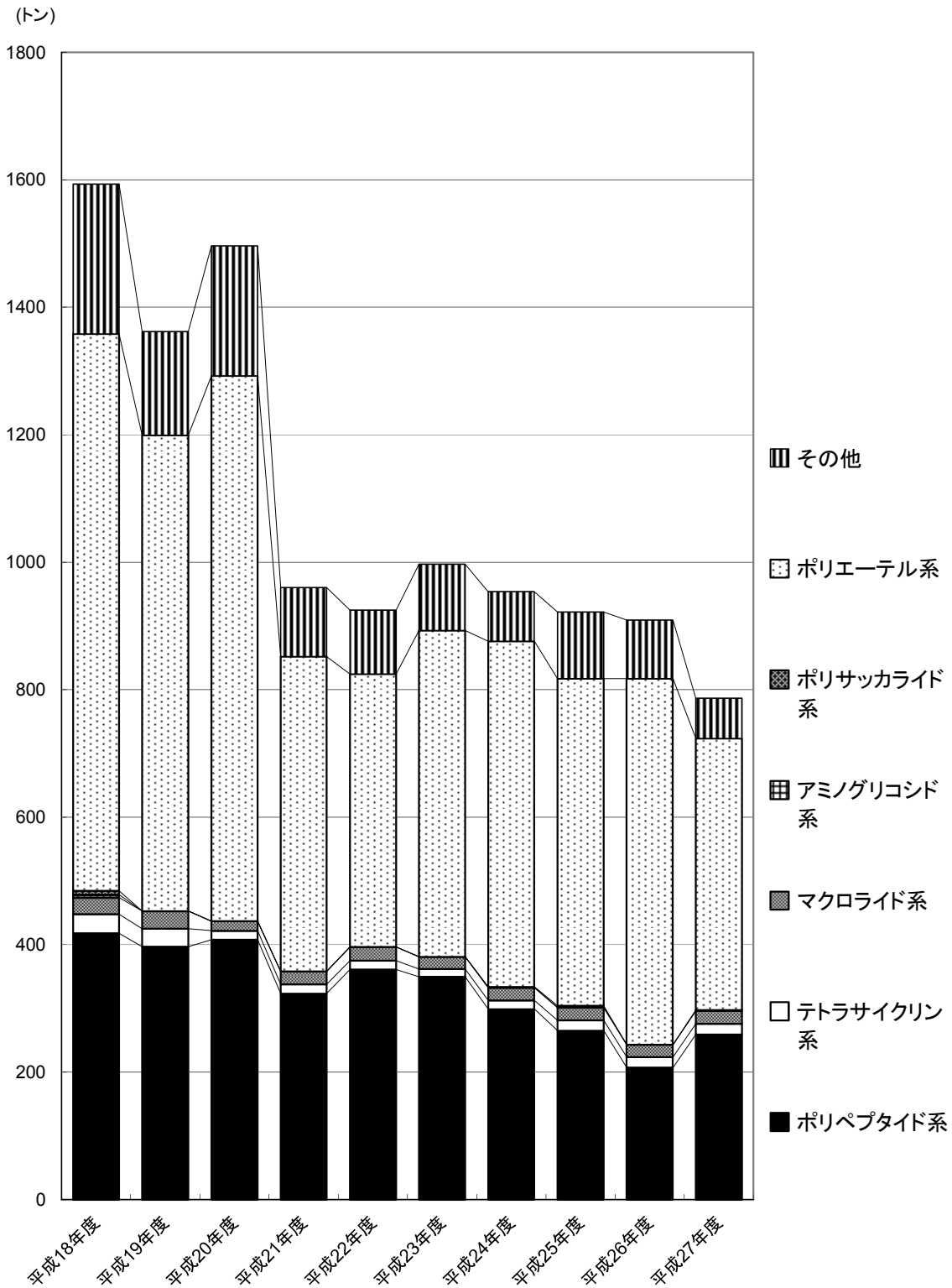


図1 特定添加物の検定合格数量の推移 (類別)

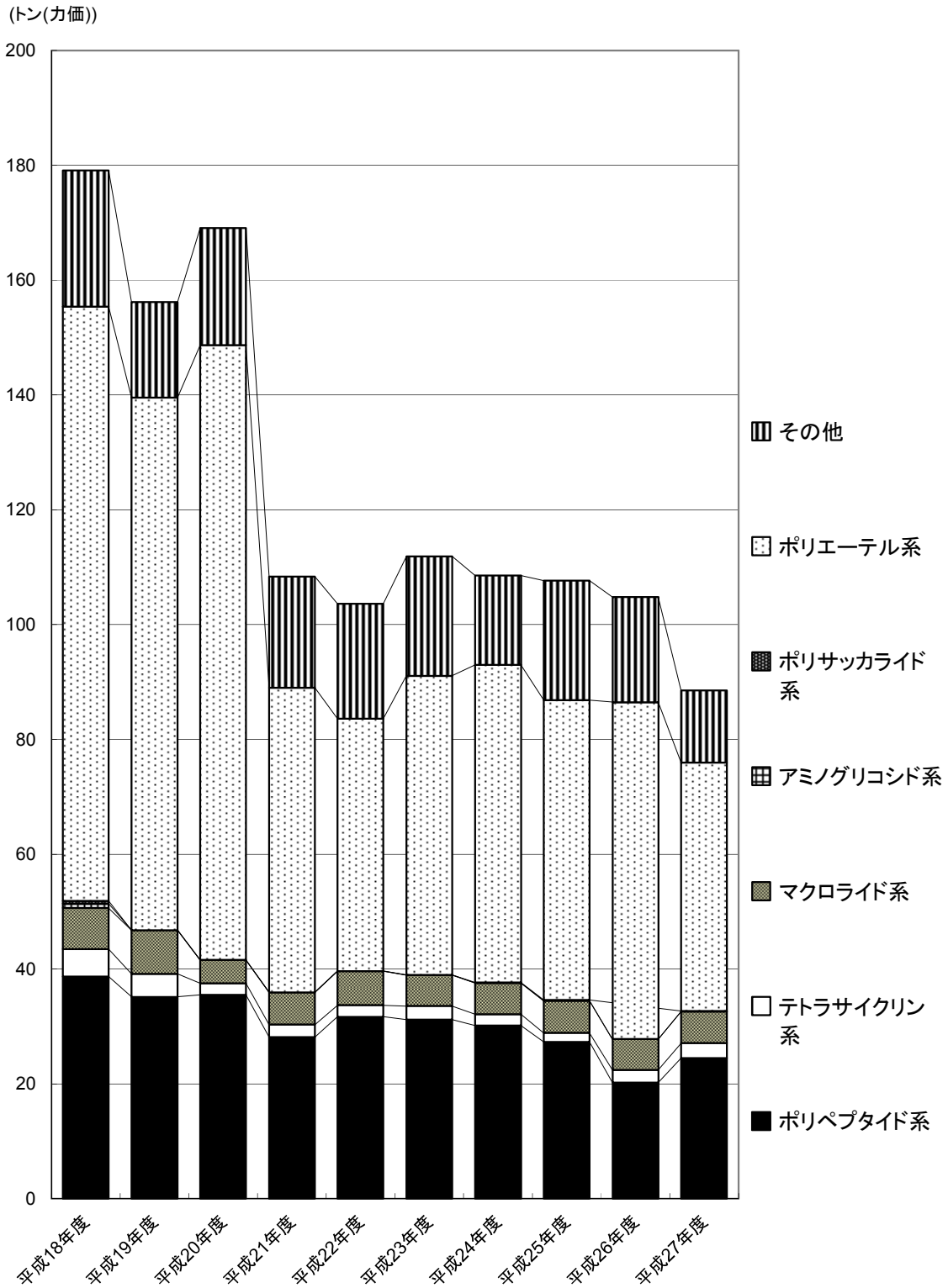


図2 特定添加物の検定合格の実量力価換算量の推移（類別）

## 5 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等

平成 27 年度末の時点で、株式会社科学飼料研究所龍野工場がエンラマイシン、サリノマイシンナトリウム、ノシヘプタイド、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム及び硫酸コリスチン、コーキン化学株式会社九州工場第三工場がノシヘプタイドに係る登録特定飼料等製造業者の事業場として登録されている。

平成 27 年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量及び実量力価換算量を表 4 に示した。なお、ラサロシドナトリウムは、表 2 で示したとおり検定実績はなかったが、登録特定飼料等製造業者による製造実績があった。

平成 27 年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量は 709 トン（対前年度比 103 %）、実量力価換算量は 104 トン（力価）（対前年度比 113 %）であった。

平成 27 年度の製造数量は、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、ノシヘプタイド、エンラマイシン、硫酸コリスチンの順に多かった。また、実量力価換算量は、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、エンラマイシン、ノシヘプタイド、硫酸コリスチンの順に多かった。

表 4 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等  
(平成 26・27 年度)

類別	特定添加物の種類	平成26年度		平成27年度	
		製造数量※ (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	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	68,680	5,494	34,620	2,770
	ノシヘプタイド	55,500	2,220	48,220	1,929
	硫酸コリスチン	4,020	402	4,000	400
	小計	128,200	8,116	86,840	5,098
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	240,320	24,032	201,200	20,120
	モネンシンナトリウム	233,540	46,708	303,760	60,752
	ラサロシドナトリウム	87,300	13,095	116,920	17,538
	小計	561,160	83,835	621,880	98,410
総計		689,360	91,951	708,720	103,508
対前年度比 (%)		101	100	103	113

※ 各登録特定飼料等製造業者より聞き取り

## 6 特定添加物の総数量等

平成 27 年度の特定添加物の検定合格数量（製造及び輸入）と登録特定飼料等製造業者による製造数量の総計（以下「総数量」という。）及びその実量力価換算量を表 5 に示した。

平成 27 年度の特定添加物の総数量を類別にみると、ポリエーテル系が最も多く、1,048 トン（検定：426 トン、登録：622 トン）と全体の 70.1 % を占め、種類別ではサリノマイシンナトリウム（32.8 %）、モネンシンナトリウム（20.7 %）、硫酸コリスチン（15.2 %）の順に多かった。また、実量力価換算量を類別にみると、同様にポリエーテル系が 142 トン（力価）（検定：43 トン（力価）、登録：98 トン（力価））と全体の 73.8 % を占め最も多く、種類別ではモネンシンナトリウム（32.3 %）、サリノマイシンナトリウム（25.5 %）、硫酸コリスチン（11.9 %）の順に多かった。



次に、平成 18 年度から平成 27 年度までの過去 10 年間における特定添加物の総数量及び実量力価換算量の類別の推移をそれぞれ図 3 及び図 4 に示した。

登録特定飼料等製造業者による製造は平成 19 年度から開始されており、平成 21 年度には、登録銘柄の大幅な追加があった影響で、登録特定飼料等製造業者による製造の割合が増加した。

特定添加物の総数量及び実量力価換算量ともに、平成 18 年度から平成 21 年度までは増減を繰り返しながらやや減少傾向にあったが、平成 22 年度に増加しほぼ横ばいで推移し、平成 27 年度は減少した。

平成 27 年度は、特定添加物の総数量全体の 47 %（前年度 43 %）、実量力価換算量全体の 54 %（前年度 47 %）を登録特定飼料等製造業者による製造が占めた。

表 5 特定添加物の総数量等  
（平成 27 年度）

類 別	特定添加物の種類	総数量※1		実量力価換算量※2	
		(kg)	構成比 (%)	(kg(力価))	構成比 (%)
ポリペプチド系	亜鉛バシトリン	9,500	0.6	950	0.5
	エンラマイシン	38,340	2.6	3,067	1.6
	ノシヘプチド	70,220	4.7	2,809	1.5
	硫酸コリスチン	227,820	15.2	22,782	11.9
	小 計	345,880	23.1	29,608	15.4
テトラサイクリン系	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	3,000	0.2	1,200	0.6
	クロルテトラサイクリン	14,000	0.9	1,400	0.7
	小 計	17,000	1.1	2,600	1.4
マクロライド系	リン酸タイロシン	19,994	1.3	5,498	2.9
	小 計	19,994	1.3	5,498	2.9
ポリサッカライド系	フラボフォスフォール	1,250	0.1	100	0.1
	小 計	1,250	0.1	100	0.1
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	489,980	32.8	48,998	25.5
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—
	ナラシン	131,625	8.8	13,163	6.9
	モネンシンナトリウム	309,840	20.7	61,968	32.3
	ラサロシドナトリウム	116,920	7.8	17,538	9.1
	小 計	1,048,365	70.1	141,667	73.8
その他	アビラマイシン	62,675	4.2	12,535	6.5
	エフロトマイシン	—	—	—	—
	バージニアマイシン	—	—	—	—
	ピコザマイシン	—	—	—	—
	小 計	62,675	4.2	12,535	6.5
総 計		1,495,164	100.0	192,008	100.0

—:実績なし

※1 検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造数量の総計

※2 検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造の実量力価換算量の総計

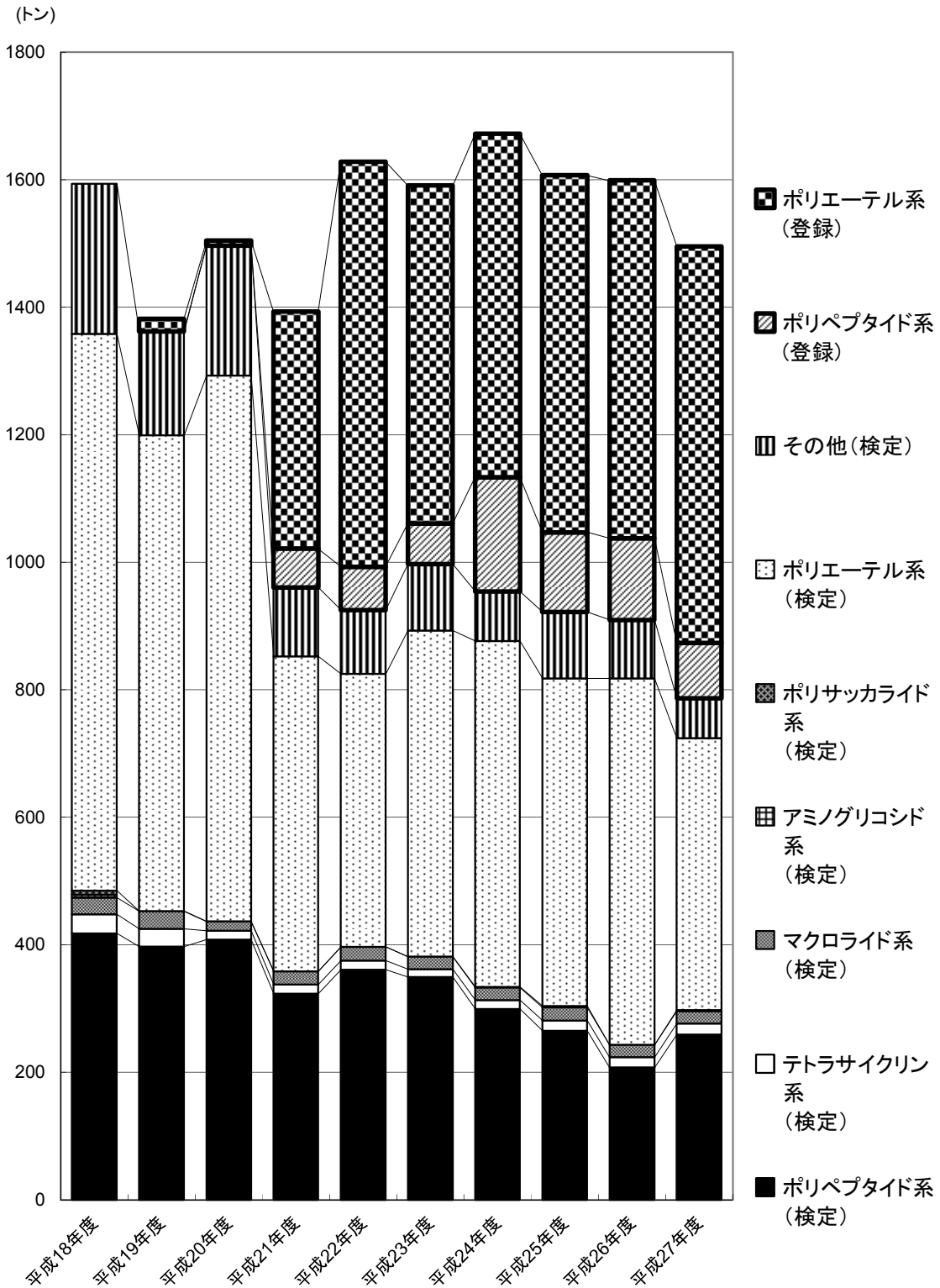


図3 特定添加物の総数量の推移(類別)

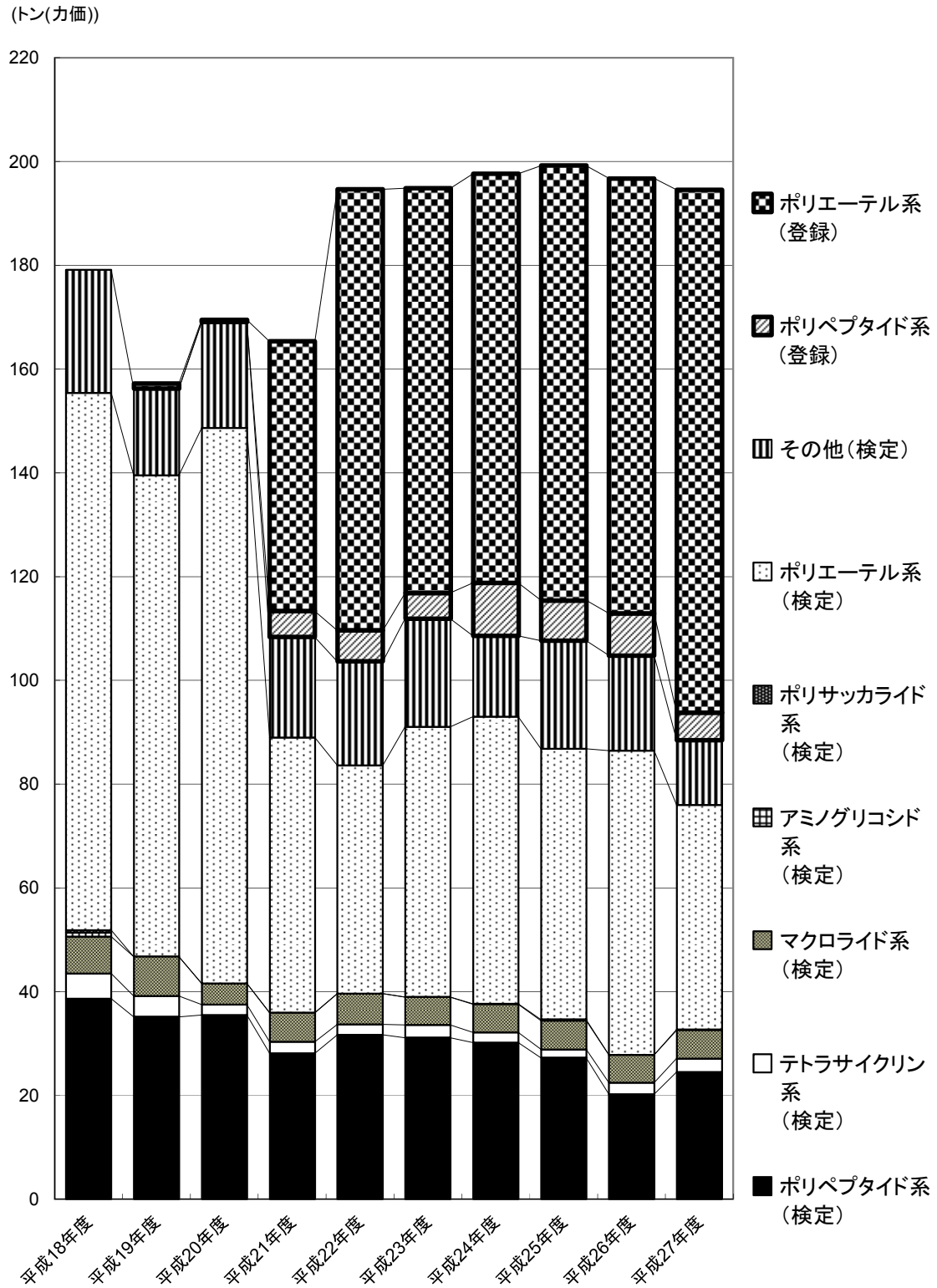


図 4 特定添加物の総数の実量力価換算量の推移（類別）

## 7 要 約

平成 27 年度の特定添加物の検定及び登録特定飼料等製造業者による製造の結果は、以下のとおりである。

- 1) 検定に合格した特定添加物は、9 業者から申請された、12 種類、20 銘柄であった。
- 2) 特定添加物の検定合格件数は 181 件、合格数量は 786 トン、実量力価換算量は 88 トン(力価)で、前年度に比べて、件数はわずかに増加し、数量及び実量力価換算量は減少した。
- 3) 特定添加物の検定合格数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、硫酸コリスチン、ナラシンの順に多かった。また、実量力価換算量についても、サリノマイシンナトリウム、硫酸コリスチン、ナラシンの順に多かった。
- 4) 特定添加物の検定合格数量について、精製級と飼料級の割合を比較すると、飼料級が全体の 66%を占めた。また、実量力価換算量では、飼料級が 65%を占めた。
- 5) 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量を種類別にみると、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウムの順に多かった。また、実量力価換算量についても、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウムの順に多かった。
- 6) 特定添加物の検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造数量とを合計した総数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、硫酸コリスチンの順に多かった。また、実量力価換算量では、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、硫酸コリスチンの順に多かった。

他誌掲載論文

(抄録)

1 HPLC-FL による配合飼料中ノシヘプタイト定量法の妥当性評価

山多 利秋, 嶋村 知紗, 浅尾 美由起, 會田 紀雄, 千原 哲夫

食品衛生学雑誌, 56(4), 173-177 (2015).

2 Formation Ratios of Zearalanone, Zearalenols, and Zearalanols *versus* Zearalenone during Incubation of *Fusarium semitectum* on Sorghum and Ratios in Naturally Contaminated Sorghum

Koji AOYAMA, Eiichi ISHIKURO, Hiroko NORIDUKI and Masakatsu ICHINOE

食品衛生学雑誌, 56(6), 247-251 (2015).

## 飼料研究報告編集委員

委員長	池田 一樹	副委員長	石岡 知洋
	青山 幸二		高橋 亜紀子
	石田 有希恵		橋本 亮
	石橋 隆幸		原 秀樹
	小野寺 聖		日比野 洋
	功刀 豊		山多 利秋
	関口 好浩		

## 飼料研究報告 第41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28年9月

編集 飼料研究報告編集委員会