

飼料研究報告

第47号

令和4年

Research Report of Animal Feed

Vol. 47
2022



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)

WOAH 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、農林水産行政と密接に連携しつつ、農業生産資材（肥料、農薬、飼料及び飼料添加物並びに土壌改良資材）や食品を対象として科学的な検査・分析を行い、農業生産資材の安全の確保、食品等の品質の改善・表示の適正化等に技術で貢献することを使命に掲げ、検査等業務に取り組んでいます。

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い、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。さらに、FAMIC の飼料部門は、国際獣疫事務局（WOAH）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の発信や研修等の実施などを通じて、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）に記載されています。

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、関係各位におかれては、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。

令和 4 年 9 月

理事長 木内 岳志

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。

令和3年度飼料分析基準検討会委員
(敬称略。五十音順。役職は令和4年3月現在。)

- | | |
|-------|--|
| 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
畜産研究部門 研究推進部 研究推進室 |
| 久城 真代 | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門 食品流通・安全研究領域
食品安全・信頼グループ 主席研究員 |
| 小池 良治 | 農林水産省動物医薬品検査所 検査第二部 総括上席研究官 |
| 後藤 哲久 | AOAC インターナショナルフェロー |
| 坂 真智子 | 株式会社エスコ 代表取締役社長 |
| 永山 敏廣 | 明治薬科大学 特任教授 |
| 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 |
| 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
食品研究部門 アドバイザー |

目 次

1 愛玩動物用飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発	
(1) 総合栄養食（ドライ，セミドライ及びウェット製品）を対象とした分析法の検討	
小塚 健志，山本 謙吾，大島 慎司 ……………	1
(2) スナック製品への適用のための妥当性確認	
高橋 亜紀子，小塚 健志，大島 慎司 ……………	13
2 飼料中のチオファネートの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発	
奥富 幸，田島 麻帆，酒井 妙衣，牧野 大作 ……………	20
3 飼料中のジクワット及びパラコート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分析法の開発	
榊原 良成，伊澤 淳修，桑原 正良，高橋 雄一， 保田 伊世，青山 幸二 ……………	33
4 飼料用稲中のベンスルフロロンメチルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発	
武田 然也，船木 紀夫，関口 好浩 ……………	46
5 稲わら中のベンフラカルブ及びカルボスルファンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の開発	
顯谷 久典，近藤 勝，船水 悦子，荒木 愛， 青山 幸二 ……………	62
6 飼料及び愛玩動物用飼料中の砒素，カドミウム，鉛及び水銀の誘導結合プラズマ質量分析計による迅速・多元素同時分析法の開発	
林 菜月，元木 太郎 ……………	73
7 カルタップの液体クロマトグラフ質量分析計による分析法の妥当性確認 ～イアコーンサイレージへの適用～	
加藤 耕一，嘉手苺 舞，桑原 正良 ……………	87

精度管理

- 1 令和3年度飼料等の共通試料による分析鑑定について
土井 雄悟, 船水 悦子, 渡辺 ちとせ, 小堀 拓也,
福田 沙樹子, 田島 麻帆 …………… 98

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（令和3年度）
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課 …… 127
- 2 特定添加物検定結果等について（令和3年度）
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課 …………… 148

他誌掲載論文（抄録）

- 1 愛玩動物用飼料中の無機ヒ素の液体クロマトグラフー誘導結合プラズマ質量分析計による定量法
鈴木 知華, 野村 昌代, 奥富 幸
(食品衛生学雑誌, 62(5), 139-147 (2021).) …………… 159
- 2 飼料中のゼアラレノン, ゼアララノン, ゼアラレノールおよびゼアララノールの分析法妥当性確認および日本における汚染実態
青山 幸二, 齋藤 晴文
(JSM Mycotoxins, 72(1), 15-22 (2022).) …………… 159
- 3 LC-MS/MSによる飼料中のクロルプロファミ定量法の試験室間共同試験
武田 然也, 倉島 ちなみ, 杉本 泰俊, 関口 好浩
(食品衛生学雑誌, 63(3), 122-127 (2022).) …………… 159

CONTENTS

1	Development of Determination Method of Melamine in Pet Foods by LC-MS/MS	
(1)	Study of Determination Method for Dry, Semi Dry and Wet Food	
	KOZUKA Kenji, YAMAMOTO Kengo and OSHIMA Shinji	1
(2)	Validation Study on Application to Snack Type Pet Food	
	TAKAHASHI Akiko, KOZUKA Kenji and OSHIMA Shinji	13
2	Development of Determination Method of Thiophanate in Feed by LC-MS/MS	
	OKUTOMI Yuki, TASHIMA Maho, SAKAI Tae and MAKINO Daisaku	20
3	Development of Simultaneous Determination Method of Diquat and Paraquat in Feed by LC-MS/MS	
	SAKAKIBARA Yoshinari, IZAWA Atsunobu, KUWABARA Masayoshi, TAKAHASHI Yuichi, YASUDA Iyo and AOYAMA Koji	33
4	Development of Determination Method of Bensulfuron-Methyl in Rice Straw, Whole-Crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS	
	TAKEDA Zenya, FUNAKI Norio and SEKIGUCHI Yoshihiro ..	46
5	Development of Simultaneous Determination Method of Benfuracarb and Carbosulfan in Rice Straw by LC-MS/MS	
	ARAYA Hisanori, KONDO Masaru, FUNAMIZU Etusko, ARAKI Ai and AOYAMA Koji	62
6	Development of Rapid Simultaneous Determination Method of Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury in Feed and Pet Food by ICP-MS	
	HAYASHI Natsuki and MOTOKI Taro	73
7	Validation Study of Determination Method of Cartap by LC-MS	
	~Application to Ear Corn Silage~	
	KATO Koichi, KADEKARU Mai and KUWABARA Masayoshi	87

§ Proficiency test

1 Proficiency Test (in the Fiscal Year 2021)

DOI Yugo, FUNAMIZU Etsuko, WATANABE Chitose,
KOBORI Takuya, FUKUDA Sakiko and TASHIMA Maho 98

§ Investigative report

1 Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2021)

Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed
Inspection Department 127

2 Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2021)

Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection
Department 148

§ Papers accepted in other journals (abstract)

1 Determination of Inorganic Arsenic for Pet Food by LC-ICP-MS

SUZUKI Chika, NOMURA Masayo and OKUTOMI Yuki
(Food Hygiene and Safety Science, 62(5), 139–147 (2021).) 159

2 Validation Study of Zearalenone, Zearalanone, Zearalenols and Zearalanols in Feeds and Occurrence in Japan

AOYAMA Koji and SAITO Harufumi
(JSM Mycotoxins, 72(1), 15–22 (2022).) 159

3 Collaborative Study of an LC-MS/MS Method for Determination of Chlorpropham in Feeds

TAKEDA Zenya, KURASHIMA Chinami,
SUGIMOTO Yasutoshi and SEKIGUCHI Yoshihiro
(Food Hygiene and Safety Science, 63(3), 122–127 (2022).) 159

1 愛玩動物用飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発

(1) 総合栄養食（ドライ，セミドライ及びウェット製品）を対象とした分析法の検討

小塚 健志^{*1}，山本 謙吾^{*2}，大島 慎司^{*3}

Development of Determination Method of Melamine in Pet Food by LC-MS/MS

(1) Study of Determination Method for Dry, Semi Dry and Wet Food

KOZUKA Kenji^{*1}, YAMAMOTO Kengo^{*2} and OSHIMA Shinji^{*3}

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

*² Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Agricultural Chemicals Inspection Department,
FAMIC),

*³ Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have studied a quantitative determination method of the melamine concentration in pet food (dry, semi dry and wet food) using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Having added acetonitrile-water (1:1) and melamine internal standard solution to a sample, melamine was extracted by homogenizing, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then diluted with acetonitrile-water (1:1). The diluted solution was purified with a solid phase extraction column (Oasis MCX, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of melamine. LC separation was then carried out on a hydrophilic interaction chromatography column (SeQuant ZIC-HILIC, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Merck Millipore Inc.; Burlington, MA, USA) with a gradient of acetonitrile and 10 mmol/L ammonium acetate solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on five kinds of pet foods. Dry food for dogs were added with 0.5 mg/kg of melamine. Dry food for cats was added with 2.5 mg/kg of melamine. Semi dry food for dogs was added with 1 mg/kg of melamine. Wet food for cats was added with 0.5 mg/kg of melamine. Wet food for dogs was added with 0.25 mg/kg of melamine. The resulting mean recoveries ranged from 90.2 % to 106 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 0.6 %.

A collaborative study was conducted by 10 laboratories using dry food for cats, semi dry food for dogs and wet food for dogs, all of which were added with melamine according to the following specifications: 2.5 mg/kg for dry food for cats, 1 mg/kg for semi dry food for dogs, 0.25 mg/kg for wet food for dogs. The resulting mean recoveries ranged from 93.8 % to 107 %. The repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were less than 3.5 % and less than 12 %, respectively. The HorRat ranged from 0.44 to 0.85.

*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 神戸センター

*² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 農薬検査部

*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

This method was thus validated as useful for inspections of melamine in pet food (dry, semi dry and wet food).

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

キーワード：メラミン；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；愛玩動物用飼料；共同試験

1 緒 言

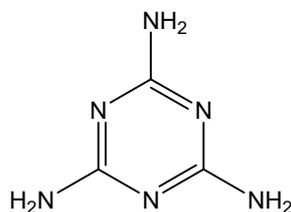
メラミンは、メラミン樹脂（メラミンとホルムアルデヒドとの重縮合により製造された合成樹脂）の原料として使用されている。その他、ラミネート等の幅広い工業用途に用いられている。また、殺虫剤であるシロマジンの代謝物でもある。

2007年に米国において、中国産原料に起因してメラミン及びシアヌル酸に汚染されたペットフードを摂取したイヌとネコにおける腎不全症例が大規模に発生し、2008年には中国において、メラミンが不正に混入された乳幼児用調製粉乳が原因と思われる乳幼児等の腎結石等の被害が報告されている¹⁾。また、中国産の卵・卵製品においても、飼料からの間接的なメラミンの残留が確認されている¹⁾。

日本における愛玩動物用飼料中のメラミンについては、愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令²⁾で基準値が2.5 mg/kgと設定されており、その分析法は、一般財団法人化学物質評価研究機構が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。）による方法³⁾（以下「CERI法」という。）に器具の洗浄操作等の規定を追加したうえで、愛玩動物用飼料等の検査法（以下「検査法」という。）⁴⁾に収載されている。

そこで、CERI法を検査法へ収載するにあたり実施した、愛玩動物用飼料の総合栄養食（ドライ、セミドライ及びウェット製品）を対象とした、添加回収試験等の追試及び共同試験の結果をとりまとめたので報告する。

参考にメラミンの構造式等を Fig. 1 に示した。



1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine

C₃H₆N₆ MW: 126.12 CAS No.: 108-78-1

Fig. 1 Chemical structure of melamine

2 実験方法

2.1 CERi 法の追試

2.1.1 試料

愛玩動物用飼料のドライ製品（犬用），ドライ製品（猫用）及びセミドライ製品（犬用）を，それぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し，分析用試料とした．また，ウェット製品（犬用）及びウェット製品（猫用）をフードプロセッサで粉碎し，分析用試料とした．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 the present study

Pet food types	Ingredients
Dry food for dogs	Grains (corn, wheat flour, wheat bran, corn gluten feed, corn gluten meal, etc.), beans (defatted soybean), oils and fats (beef oil, chicken oil), meats (pork meal, poultry by-product meal, chicken extract, powdered beef bouillon, etc.), fishes (fish meal, etc.), vegetables (spinach, etc.), minerals (Ca, P, Na, Cl, Zn, Fe, Cu, Co, Mn, I), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, K ₃ , choline, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, biotin), antioxidants (tocopherol mixture, rosemary extract)
Dry food for cats	Chicken, rice, corn gluten, corn, animal fat, soybean, chicken extract, cellulose, yeast, fish oil, minerals (Na, K, Cl, Ca, S, Fe, Cu, Zn, I, Mn, Se), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, β -carotene, niacin, pantothenic acid, folic acid, biotin, choline), amino acids (arginine, taurine, methionine), antioxidants (tocopherol mixture, citric acid, rosemary extract)
Semi dry food for dogs 1	Grains (corn, wheat flour, etc.), sugars (high-fructose corn syrup, sucrose), meats (poultry by-product meal, beef meal, powdered chicken breast tender, etc.), beans (defatted soybean, powdered soybean, etc.), animal fat, fishes (fish meal, dried small fish), brewery yeast, cellulose powder, vegetables (spinach powder, carrot powder, pumpkin powder, etc.), cheese powder, propylene glycol, minerals (Ca, Cl, Cu, I, K, P, Zn), emulsifier, preservative (potassium sorbate), malic acid, food colors (titanium dioxide, acid red, tartrazine, sunset yellow FCF, brilliant blue FCF), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, K, choline, pantothenic acid), antioxidants (tocopherol mixture, herb extract)
Semi dry food for dogs 2	Grains (corn, wheat flour, etc.), meats (poultry by-product meal, beef meal, powdered chicken breast tender, etc.), sugars (high-fructose corn syrup, sucrose, oligosaccharide), beans (defatted soybean, etc.), animal fat, brewery yeast, vegetables (beet pulp, carrot powder, pumpkin powder, spinach powder), herb, fishes (dried small fish), propylene glycol, glycerin, minerals (Ca, Cl, Cu, I, K, P, Zn), emulsifier, preservative (potassium sorbate), acidity regulators (malic acid, citric acid), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, K, choline, pantothenic acid), food colors (titanium dioxide, acid red, tartrazine, sunset yellow FCF, brilliant blue FCF), antioxidants (tocopherol mixture, herb extract)
Wet food for cats	Tuna, whitebait, oligosaccharide, minerals (Ca, P, Fe, Cu, Mn, Zn, I), vitamins (A, D, E, K, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , niacin, pantothenic acid, folic acid, biotin, choline)
Wet food for dogs	Chicken meat, beef meat, rice, oligosaccharide, polysaccharide thickener, minerals, emulsifier, vitamins, color former (sodium nitrite)

2.1.2 試薬

1) アセトニトリル（LC-MS/MS の溶離液のみ LC-MS 用）及びメタノールは残留農薬・PCB 試験用，酢酸アンモニウムは LC-MS 用，その他の試薬は試薬特級を用いた．水は Milli-Q Integral 5（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた．

2) メラミン標準原液

メラミン標準品（和光純薬工業製，純度 99.0 %）10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリル-水（1+1）を加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてメラ

ミン標準原液を調製した（この液 1 mL は、メラミンとして 100 μg を含有）。

3) メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 内標準液

メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 標準原液（Cambridge Isotope Laboratories Inc.製，純度 $^{13}\text{C}_3$ 99 %， $^{15}\text{N}_3$ 98 %，100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ，標線までアセトニトリル-水（1+1）を加えてメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 内標準液を調製した（この液 1 mL は，メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ として 1 μg を含有）。

4) 検量線作成用標準液

使用に際して，メラミン標準原液及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 内標準液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し，1 mL 中にメラミンとして 0.5，1，2，5，10，50，100 及び 200 ng を含有し，かつメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ として 5 ng を含有する検量線作成用標準液を調製した。

5) ケイソウ土

ハイフロスーパーセル（和光純薬工業製）を用いた。

抽出液の吸引ろ過に当たり，ブフナー漏斗上に積層したときに約 5 mm の厚さになる量のケイソウ土をビーカーにとり，液面がケイソウ土の容積の 2 倍量程度に達するまでアセトニトリル-水（1+1）をビーカーに加えて懸濁させた。流出液を受ける容器をブフナー漏斗の下に置き，懸濁液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後，先のビーカー及びろ紙上のケイソウ土を順次少量のアセトニトリル-水（1+1）で洗浄し，同様に吸引ろ過した。このビーカー及びケイソウ土の洗浄操作を更に数回繰り返した。

6) 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムメタノール溶液

水酸化ナトリウム 8 g を水 100 mL に溶かし，更にこの液 5 mL にメタノール 95 mL を加えて調製した。

7) 0.1 mol/L 塩酸メタノール溶液

塩酸 8.5 mL に水を加えて 50 mL とし，更にこの液 5 mL にメタノール 95 mL を加えて調製した。

2.1.3 装置及び器具

1) 粉砕機：ZM 200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）

2) ホモジナイザー：Polytron PT-K Kinematica 製

3) 強酸性陽イオン交換体ミニカラム（以下「ミニカラム」という。）：Oasis MCX（充てん剤量 500 mg）Waters 製

4) メンブランフィルター：HLC-DISK 13 溶媒系（孔径 0.2 μm ，直径 13 mm，PTFE）関東化学製

5) LC-MS/MS：

LC 部：ACQUITY UPLC Waters 製

MS/MS 部：Xevo TQD Waters 製

2.1.4 定量方法

ガラス器具は，器具に由来するメラミンの影響を防ぐため，あらかじめ超音波洗浄した後，水道水，超純水，アセトニトリルで順次洗浄したものをを用いた。

1) 抽出

分析試料 1 g を正確に量って 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ，アセトニトリル-水（1+1）

20 mL を加えた。さらに、この共栓遠心沈殿管にメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 内標準液 0.5 mL を正確に加えた後、ホモジナイザーで 1 分間かき混ぜて抽出した。50 mL の首太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のせたろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した。ケイソウ土上の残さを先の共栓遠心沈殿管に戻し、アセトニトリル-水 (1+1) 10 mL を加え、ホモジナイザーで 1 分間かき混ぜて抽出した。抽出液を同様に吸引ろ過して、先の首太全量フラスコに加えた後、首太全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (1+1) を加え、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

ミニカラムを 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムメタノール溶液 5 mL, 0.1 mol/L 塩酸メタノール溶液 5 mL, アセトニトリル 5 mL 及びギ酸 (1+24) 5 mL で順次洗浄した。試料溶液 2 mL をあらかじめギ酸 (1+24) 3 mL を入れたミニカラムに加えて混和し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。さらに、アセトニトリル 5 mL 及びアセトニトリル-ジエチルアミン (499+1) 5 mL を順次ミニカラムに加えて洗浄した後、圧注して全量を流出させた。100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-ジエチルアミン (49+1) 15 mL をミニカラムに加えてメラミンを溶出させた後、圧注して全量を溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル 4 mL を正確に加え、5 分間超音波処理して残留物を溶かした後、メンブランフィルター (孔径 0.2 μm 以下) でろ過し、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各検量線作成用標準液各 2 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 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	SeQuant ZIC-HILIC (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 5 μm), Merck Millipore
Mobile phase	Acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate solution (17:3) (hold for 7 min) → 8 min → (2:3) (hold for 20 min) → 8 min → (17:3) (hold for 7 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Ion source temperature	150 °C
Desolvation temperature	400 °C
Capillary voltage	0.6 kV

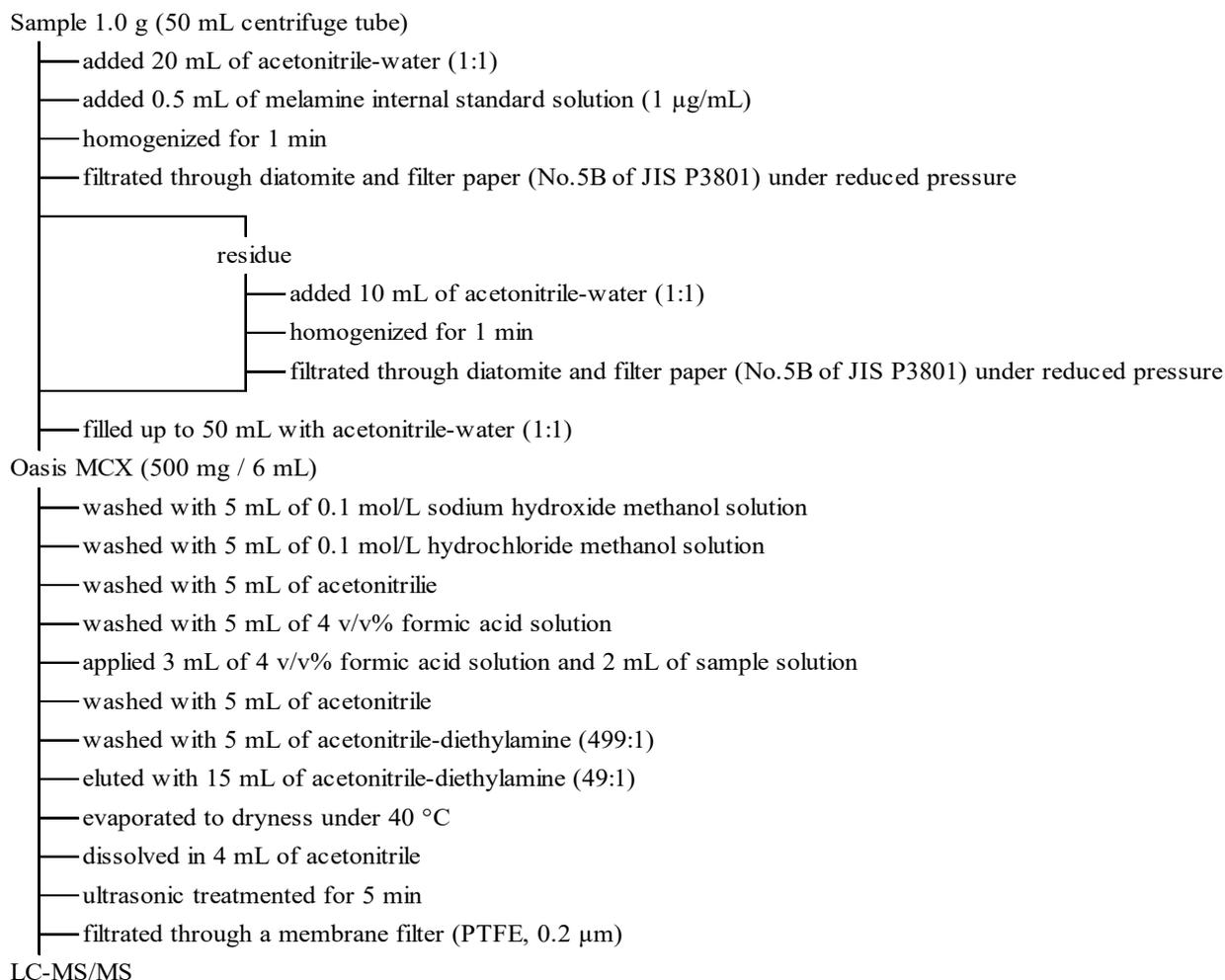
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (m/z)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier (m/z)	Qualifier (m/z)		
Melamine	127	85	-	46	16
		-	68	46	22
Melamine- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$	133	89	-	50	18

4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからメラミン及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のメラミン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for melamine in pet food

2.2 共同試験

2.2.1 試 料

2.1.1 で粉砕したドライ製品（猫用）、セミドライ製品（犬用）2及びウェット製品（犬用）を用いた。これらについて、約 1.5 g ずつ小分けしたもの（試料名は非表示）各 2 袋を試験用試料として計 6 袋を各試験室に配付した。

2.2.2 試 薬

1) 各試験室で準備した試薬

アセトニトリル及びメタノールは市販の液体クロマトグラフ用又はこれと同等以上のもの、その他の試薬は試薬特級又はこれと同等以上のものを用いた。ケイソウ土はハイフロスーパーセル（和光純薬工業製）と同等なものを用いた。水は LC-MS/MS の溶離液として使用可能な精製水（例えば、JIS K0557 に定義された A3 又は A4 の水）を用いた。

2) 配付試薬

検量線作成用標準原液（メラミン 10 $\mu\text{g/mL}$ 含有），内標準原液（メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 1 $\mu\text{g/mL}$ 含有），ドライ製品添加用標準液（メラミン 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 含有），セミドライ製品添加用標準液（メラミン 1 $\mu\text{g/mL}$ 含有）及びウェット製品添加用標準液（メラミン 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 含有）を各 1 本，濃度は非通知で 2.2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。

2.2.3 分析試料

2.2.1 の試験用試料を非明示の 2 点反復で用いた。分析試料としては，メラミンとしてドライ製品に 2.5 mg/kg 相当量（試験用試料 1.0 g に対してドライ製品添加用標準液 1 mL を正確に添加）を，セミドライ製品に 1 mg/kg 相当量（試験用試料 1.0 g に対してセミドライ製品添加用標準液 1 mL を正確に添加）を，ウェット製品に 0.25 mg/kg 相当量（試験用試料 1.0 g に対してウェット製品添加用標準液 1 mL を正確に添加）を，分析開始の前日（ウェット製品のみ分析開始 30 分前）に添加して調製した。

2.2.4 定量方法

2.1.4 によった。

2.2.5 報告方法

分析値は，分析試料中濃度（mg/kg）で表し，4 桁目を四捨五入して有効桁数 3 桁まで報告を求めた。

2.2.6 分析実施期間

平成 25 年 2 月 18 日から平成 25 年 3 月 26 日まで

2.2.7 解析方法

結果の解析は，国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{5), 6)}を参考に，Cochran 検定，single Grubbs 検定及び paired 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⁷⁾を用いて HorRat を求めた。

2.2.8 参加試験室

協同飼料株式会社研究所，一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所，財団法人マイコトキシシン検査協会，財団法人日本食品分析センター彩都研究所，一般財団法人新日本検定協会，社団法人日本科学飼料検査協会科学飼料研究センター，独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，同仙台センター，同名古屋センター，同神戸センター（計 10 試験室）

3 結果及び考察

3.1 CERI 法の追試

3.1.1 検量線の作成

1 mL 中にメラミンとして 0.5, 25, 50, 100, 125, 150, 175 及び 200 ng を含有し，かつメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ として 5 ng を含有する標準液 2 μL を LC-MS/MS に注入し，得られた SRM クロマトグラムからメラミン及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ のピーク面積比を求めて検量線を作成した。その結果，検量線は Fig. 2 のとおりとなり，メラミン及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ のピーク面積比 0.1~40（メラミンとして 0.5~200 ng/mL（注入量として 1~400 pg））の範囲で直線性を示した。

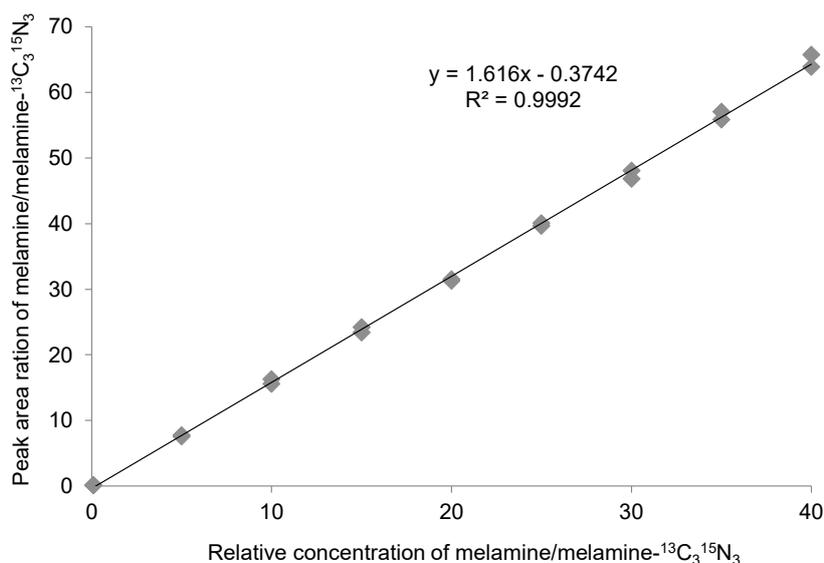


Fig. 2 Internal standard calibration curves of melamine by peak area

3.1.2 試薬，器具等に由来するメラミンの除去方法の検討

2.1.1 で調製した試料を用い，CERI 法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入したところ，いずれの試料からもメラミンのピークが検出されたことから，試薬，器具等からメラミンのピークが検出されるかどうかを確認した．試料を用いずに CERI 法の一連の操作手順により調製した空試験溶液を LC-MS/MS で測定した結果，試薬等からもメラミンが検出されることが判明した．

そこで，確認された試薬等に由来するメラミンを除去するための方法として，器具の洗浄等を検討した．具体的には次の 1)~3)に留意した上で，CERI 法により分析したところ，空試験溶液におけるメラミン量の低減が認められた．

- 1) ガラス製の器具を使用する．使用にあたっては，あらかじめ超音波洗浄した後，水道水，超純水，アセトニトリルで順次洗浄したものを使用する．
- 2) ミニカラムにリザーバーを連結して使用する場合，リザーバーはガラス製のシリンジを用いる．
- 3) ケイソウ土はアセトニトリル-水 (1+1) に懸濁させ，吸引しながらろ紙上に約 5 mm の厚さになる量を流し込み，更にアセトニトリル-水 (1+1) を加えて洗浄する．

3.1.3 添加回収試験

3.1.2 の器具の洗浄等に留意した上で，共同試験に先立ち予備検討として CERI 法に従って添加回収試験を実施した．分析試料は，ドライ製品（犬用）に 0.5 mg/kg 相当量，ドライ製品（猫用）に 2.5 mg/kg 相当量，セミドライ製品（犬用）2 に 1 mg/kg 相当量，ウェット製品（猫用）に 0.5 mg/kg，ウェット製品（犬用）に 0.25 mg/kg 相当量（ウェット製品はいずれも原物中濃度）のメラミンを添加して調製した．

その結果は Table 4 のとおり，平均回収率は 90.2~106 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 2.9 %以下の成績が得られた．

Table 4 Recoveries for melamine

Spiked level (mg/kg)	Dry food for dogs		Dry food for cats		Semi dry food for dogs 2		Wet food for cats		Wet food for dogs	
	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	106	1.0
0.5	90.2	2.9	-	-	-	-	102	0.6	-	-
1	-	-	-	-	96.5	0.9	-	-	-	-
2.5	-	-	97.3	2.6	-	-	-	-	-	-

-: Not tested

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.2 共同試験

2.2により共同試験を実施した結果は Table 5 のとおりであった。1 試験室において、すべての試料で指示した方法からの逸脱があったため、当該試験室の結果は除外した。平均回収率は 93.8~107 %，RSD_r は 2.1~3.5 %，RSD_R は 7.0~12 %，HorRat は 0.44~0.85 であり，試験法の妥当性確認法に定められた室間再現精度の目標値（ドライ製品で 28 %以下，セミドライ製品で 32 %以下，ウェット製品で 39 %）を満たしていた。

なお，参考として各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 6 に示した。

Table 5 Collaborative study for melamine

Lab. No.	Dry food for cats		Semi dry food for dogs 2		Wet food for dogs	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	2.23	2.26	0.867	0.835	0.264	0.266
2	2.49	2.41	0.953	0.958	0.243	0.247
3	1.74	1.88	0.821	0.874	0.219	0.202
4	2.53	2.58	1.00	1.01	0.269	0.264
5	1.87	2.12	0.944	0.896	0.336	0.312
6	2.53	2.57	0.953	0.945	0.256	0.267
7	2.49	2.47	0.999	0.992	0.276	0.280
8	2.43	2.47	1.04	1.02	0.301	0.289
9	2.63	2.53	0.972	0.995	0.251	0.271
Spiked level (mg/kg)	2.5		1		0.25	
No. of labs ^{a)}	9		9		9	
No. of outliers ^{b)}	0		0		0	
Mean value (mg/kg)	2.35		0.949		0.267	
Mean recovery (%)	93.8		94.9		107	
RSD _r ^{c)} (%)	3.3		2.1		3.5	
RSD _R ^{d)} (%)	12		7.0		12	
PRSD _R ^{e)} (%)	14		16		20	
HorRat	0.85		0.44		0.62	

a) Number of laboratories retained the outliers were removed.

b) Number of the removed outliers

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 6 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d. × length, particle size)
1	LC: Alliance2695, Waters MS/MS: Quattro micro API, Micromass	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm)
2	LC: Alliance2695, Waters MS/MS: Quattro Premier XE, Waters	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
3	LC; Prominence, Shimadzu MS/MS: API4000QTrap, AB Sciex	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC System, Waters MS/MS: Xevo TQD, Waters	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
5	LC: 1200series, Agilent Technologies MS/MS: 6410, Agilent Technologies	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
6	LC: ACQUITY UPLC System, Waters MS/MS: ACQUITY TQ Detector, Waters	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
7	LC; Prominence, Shimadzu MS/MS: TSQ QUANTUM ULTRA, Thermo SCIENTIFIC	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
8	LC; Prominence, Shimadzu MS/MS: API4000, AB Sciex	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
9	LC: ACQUITY UPLC System, Waters MS/MS: ACQUITY TQ Detector, Waters	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)

4 まとめ

愛玩動物用飼料の総合栄養食中のメラミンについて、CERI法の検査法への収載の可否を検討したところ、以下の結果が得られ、器具の洗浄等に留意することで、収載が可能であると考えられた。

- 1) 検量線はメラミン及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ のピーク面積比0.1~40（メラミンとして0.5~200 ng/mL（注入量として1~400 pg））の範囲で直線性を示した。
- 2) 器具の洗浄等に留意することにより、空試験溶液におけるメラミン量の低減が認められた。
- 3) メラミンとしてドライ製品（犬用）に0.5 mg/kg相当量、ドライ製品（猫用）に2.5 mg/kg相当量、セミドライ製品（犬用）に1 mg/kg相当量、ウェット製品（猫用）に0.5 mg/kg、ウェット製品（犬用）に0.25 mg/kg相当量（ウェット製品はいずれも原物中濃度）を添加した試料を用いて、器具の洗浄等に留意した上で、CERI法に従って定量したところ、平均回収率は90.2~106%， RSD_r は2.9%以下であった。
- 4) メラミンとしてドライ製品に2.5 mg/kg相当量、セミドライ製品に1 mg/kg相当量を、犬用ウェット製品に0.25 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、試験法の妥当性確認法に定められた室間再現精度の目標値を満たす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協同飼料株式会社研究所、一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所、財団法人マイコトキシン検査協会、財団法人日本食品分析センター彩都研究所、一般財団法人新日本検定協会及び社団法人日本科学飼料検査協会科学飼料研究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) 食品安全委員会：メラミン等による健康影響について，平成 20 年 10 月 9 日 (2008).
- 2) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 3) 一般財団法人化学物質評価研究機構：平成 23 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業報告書 (2012).
- 4) 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).
- 5) Horwitz W: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995).
- 6) Latimer Jr GW.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 7) Thompson M: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, 125(3), 385-386 (2000)

1 愛玩動物用飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発

(2) スナック製品への適用のための妥当性確認

高橋 亜紀子^{*1}, 小塚 健志^{*2}, 大島 慎司^{*3}

Development of Determination Method of Melamine in Pet Food by LC-MS/MS

(2) Validation Study on Application to Snack Type Pet Food

TAKAHASHI Akiko^{*1}, KOZUKA Kenji^{*2} and OSHIMA Shinji^{*3}

(*¹ Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)
(Now Planning and Coordination Department, FAMIC),

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

^{*3} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have made a validation study on the applicability of a determination method of melamine in pet food (dry, semi dry and wet food), which has been listed in the inspection method for pet foods of Japan, to snack type pet food.

Having added acetonitrile-water (1:1) and melamine internal standard solution to a sample, melamine was extracted by homogenizing, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then diluted with acetonitrile-water (1:1). The diluted solution was purified with a solid phase extraction column (Oasis MCX, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of melamine. LC separation was then carried out on a hydrophilic interaction chromatography column (SeQuant ZIC-HILIC, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Merck Millipore Inc.; Burlington, MA, USA) with a gradient of acetonitrile and 10 mmol/L ammonium acetate solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on five kinds of snack type pet foods. Melamine was added at the levels of 0.5 mg/kg and 2.5 mg/kg to samples respectively. The resulting mean recoveries ranged from 84.6 % to 106 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 6.4 %.

This method was thus validated as useful for inspections of melamine in snack type pet food.

Key words: melamine; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); pet food; snack type pet food

キーワード：メラミン；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；愛玩動物用飼料；スナック製品

1 緒 言

愛玩動物用飼料等の検査法（以下「検査法」という。）¹⁾に収載する分析法については、流通量

^{*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 企画調整部

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 神戸センター

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

及び摂食量の多い、総合栄養食（ドライ、セミドライ及びウェット製品）を対象に先行して整備を進めたが、平成 25 年に米国 FDA が、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の発生を公表²⁾したことから、我が国でもジャーキー等のスナック製品³⁾（以下「スナック製品」という。）を検査法の対象とするための検討を始めた。

これを受けて、有害物質の一つであるメラミンの分析法についても検討が必要となり、先に検査法に記載された総合栄養食を対象とする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。）による分析法について、スナック製品に適用するための妥当性確認を実施したので、その結果を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

市販の愛玩動物用のスナック製品のうち成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類は、それぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し、分析用試料とした。なお、有姿のままでは粉碎が困難な試料は、はさみ等を用いて細断したのち粉碎した。粒度が 1 mm 以下であった粉ミルクはそのまま分析用試料として用いた。

なお、検討に用いたスナック製品を Table 1 に示した。

Table 1 Ingredients list of snack type pet foods used in the present study

Pet food types	Ingredients
Formed jerky for dogs	Meats (chicken breast tender, etc.), starches, vegetables (cabbage, carrot, etc.), oils and fats, dietary fibers (cellulose powder), thickening stabilizer (modified starch, glycerin), preservative (potassium sorbate), flavor, food colors (titanium dioxide, new cocchine, acid red, tartrazine, sunset yellow FCF, brilliant blue FCF), antioxidants (tocopherol mixture, rosemary extract)
Formed jerky for cats	Meats (chicken, beef), soy protein, wheat flour, fish meat, beef oil, silver vine, glycerin, thickening stabilizer (modified starch), sorbitol, minerals (Ca, P, Na), preservative (sorbic acid, sodium dehydroacetate), perilla seasoning, color former (sodium nitrite), deodorant (sodium polyacrylate), food colors (caramel, acid red), vitamin E
Dried jerky for dogs (hard type)	Chicken breast tender, pea protein, glycerin, sorbitol, minerals (Na), acidity regulator
Dried jerky for dogs (soft type) 1	Chicken breast tender, egg white, glucosamine, oligosaccharide, cartilage extract (chondroitin-containing), trehalose, glycerin, acidity regulator, propylene glycol, thickening stabilizer (modified starch, xanthan gum), potassium chloride, antioxidants (sodium erythorbate), preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite), raising agent
Dried jerky for dogs (soft type) 2	Gizzard, salt, sorbitol, propylene glycol, antioxidants (sodium erythorbate, V.E, V.C), preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (soft type) 3	Beef rib, salt, sorbitol, propylene glycol, antioxidants (sodium erythorbate, V.E, V.C), preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite)
Confectionery (biscuit) for dogs	Wheat flour, margarine, granulated sugar, egg, fermented rice germ·soybean extract, galactooligosaccharide, protein concentrated whey powder (dairy products), skim milk, lactose, vegetable oil, sweetner (D-sorbitol), calcium carbonate, green tea extract, antioxidants (V.E, rosemary extract)
Milk powder for dogs	Milk powder (skim milk, casein), oils and fats (vegetable oil, animal fat, γ -linolenic acid), egg yolk powder, soy protein, oligosaccharide, L-carnitine, minerals (Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), emulsifier, vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, K, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, choline), flavor, taurine

2.2 試薬

- 1) アセトニトリル (LC-MS/MS の溶離液のみ LC-MS 用) 及びメタノールは残留農薬・PCB 試験用, 酢酸アンモニウムは LC-MS 用, その他の試薬は試薬特級を用いた. 水は Milli-Q Integral 5 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた.
- 2) メラミン標準原液
メラミン標準品 (和光純薬工業製, 純度 99.0 %) 10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, アセトニトリル-水 (1+1) を加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてメラミン標準原液を調製した (この液 1 mL は, メラミンとして 100 µg を含有) .
- 3) メラミン-¹³C₃¹⁵N₃ 内標準液
メラミン-¹³C₃¹⁵N₃ 標準原液 (Cambridge Isotope Laboratories Inc. 製, 純度 ¹³C₃ 99 %, ¹⁵N₃ 98 %, 100 µg/mL) 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ, 標線までアセトニトリル-水 (1+1) を加えてメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ 内標準液を調製した (この液 1 mL は, メラミン-¹³C₃¹⁵N₃ として 1 µg を含有) .
- 4) 検量線作成用標準液
使用に際して, メラミン標準原液及びメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ 内標準液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し, 1 mL 中にメラミンとして 0.5, 1, 2, 5, 10, 50, 100 及び 200 ng を含有し, かつメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ として 5 ng を含有する検量線作成用標準液を調製した.
- 5) ケイソウ土
ハイフラスーパーセル (和光純薬工業製) を用いた.
抽出液の吸引ろ過に当たり, ブフナー漏斗上に積層したときに約 5 mm の厚さになる量のケイソウ土をビーカーにとり, 液面がケイソウ土の容積の 2 倍量程度に達するまでアセトニトリル-水 (1+1) をビーカーに加えて懸濁させた. 流出液を受ける容器をブフナー漏斗の下に置き, 懸濁液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後, 先のビーカー及びろ紙上のケイソウ土を順次少量のアセトニトリル-水 (1+1) で洗浄し, 同様に吸引ろ過した. このビーカー及びケイソウ土の洗浄操作を更に数回繰り返した.
- 6) 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムメタノール溶液
水酸化ナトリウム 8 g を水 100 mL に溶かし, 更にこの液 5 mL にメタノール 95 mL を加えて調製した.
- 7) 0.1 mol/L 塩酸メタノール溶液
塩酸 8.5 mL に水を加えて 50 mL とし, 更にこの液 5 mL にメタノール 95 mL を加えて調製した.

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機: ZM 200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)
- 2) ホモジナイザー: Polytron PT-K Kinematica 製
- 3) 強酸性陽イオン交換体ミニカラム (以下「ミニカラム」という.) : Oasis MCX (充てん剤量 500 mg) Waters 製
- 4) メンブランフィルター: HLC-DISK 13 溶媒系 (孔径 0.2 µm, 直径 13 mm, PTFE) 関東化学製

5) LC-MS/MS :

LC 部 : 1200 Series Agilent Technologies 製

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

2.4 定量方法

検査法第 9 章の 1 の B によった。本報告における LC-MS/MS の測定条件を Table 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	SeQuant ZIC-HILIC (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm), Merck Millipore
Mobile phase	Acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate solution (17:3) (hold for 7 min) → 8 min → (2:3) (hold for 20 min) → 8 min → (17:3) (hold for 7 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	340 kPa
Drying gas	350 °C
Capillary voltage	4 kV

Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Fragmentor voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
Melamine	127	85	-	100	16
		-	68	100	30
Melamine- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃	133	89	-	100	18

3 結果及び考察

3.1 妨害物質の検討

8 種類のスナック製品各 1 点を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

ただし、本法においては、使用する試薬・器具等に由来するメラミンが検出されることが判明しており、検出限界未満となる小さなものではあるが、いずれの試料の測定においてもメラミンのピークが検出された。これらピークを試料中のメラミン量として算出すると 0.0232 ~ 0.0645 mg/kg であった。

3.2 添加回収試験

5 種類のスナック製品についてそれぞれ 0.5 及び 2.5 mg/kg 相当量のメラミンを添加した試料（最終試料溶液中で各 5 及び 25 ng/mL 相当量）を用いて、本法に従って 5 点併行で定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。その結果は Table 5 のとおり、メラミンの平均回収率は 84.6~106 %、繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 6.4 %以下であり、愛玩動物用飼料等の

検査法第 11 章試験法の妥当性確認法（以下「試験法の妥当性確認法」という。）で定められた真度及び併行精度の目標値（真度：80~110%，精度：0.5 mg/kg 添加では 18%，2.5 mg/kg 添加では 14%）を満たす良好な結果であった。

Table 5 Recoveries for melamine

Pet food types	Spiked level (mg/kg)			
	0.5		2.5	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Formed jerky for cats	99.1	1.4	98.6	1.6
Dried jerky for dogs (hard type)	106	2.1	98.7	0.8
Dried jerky for dogs (soft type) 1	99.5	1.1	98.6	1.3
Confectionery (biscuit) for dogs	98.0	2.2	97.9	0.8
Milk powder for dogs	93.8	1.4	84.6	6.4

a) Mean ($n=5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.3 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、3.2 の添加回収試験により得られたプロダクトイオンのクロマトグラム（Fig. 1）からメラミンのピークにおける SN 比を確認した。その結果、いずれの分析用試料においても、添加回収試験におけるクロマトグラムから得られたピークの SN 比が 10 以上であった添加濃度は 0.5 mg/kg であり、また、同様に SN 比が 3 以上であった添加濃度は 0.2 mg/kg であった。このことから、本法におけるスナック製品の定量限界（下限）及び検出限界は、従来のドライ及びセミドライ製品と同様、それぞれ 0.5 mg/kg 及び 0.2 mg/kg であった。

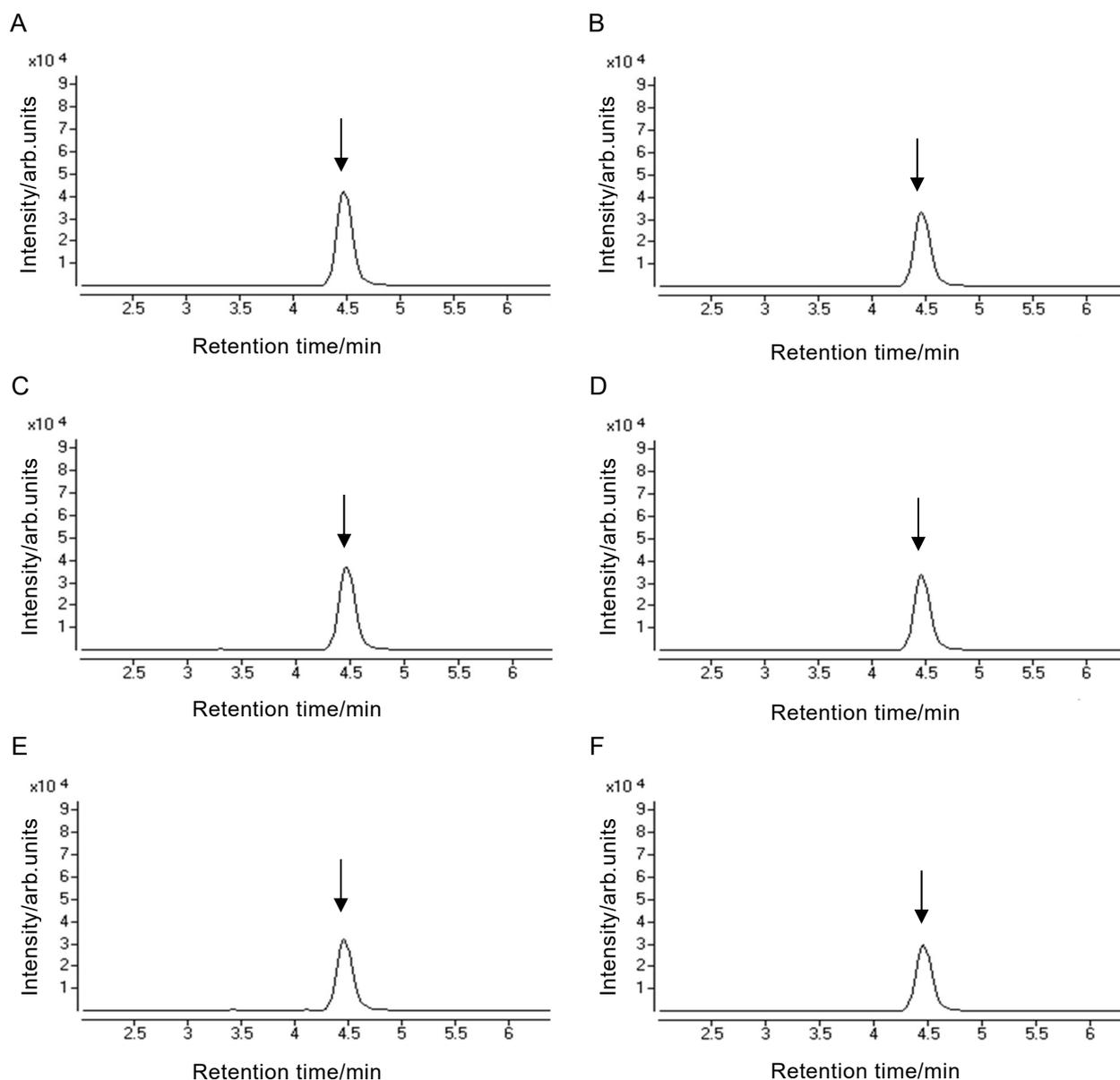


Fig. 1 Typical selected reaction monitoring chromatograms of melamine in standard and spiked sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrow indicates the retention time of melamine.)

A: Standard solution (5 ng/mL)

B: Sample solution of formed jerky for cats (spiked at 0.5 mg/kg of melamine)

C: Sample solution of dried jerky for dogs (hard type) (spiked at 0.5 mg/kg of melamine)

D: Sample solution of dried jerky for dogs (soft type) 1 (spiked at 0.5 mg/kg of melamine)

E: Sample solution of confectionery (biscuit) for dogs (spiked at 0.5 mg/kg of melamine)

F: Sample solution of milk powder for dogs (spiked at 0.5 mg/kg of melamine)

4 まとめ

検査法に既記載の総合栄養食を対象としたメラミンの分析法について、スナック製品への適用の可否を検討したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 本法に従って得られたSRMクロマトグラムでは、8種類のスナック製品において定量を妨げるピークは認められなかった。なお、いずれのスナック製品においても検出限界未満のメラミンのピークが検出された。
- 2) 5種類のスナック製品についてそれぞれ0.5及び2.5 mg/kg相当量のメラミンを添加した試料を用いて、本法に従って5点併行で定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めたところ、試験法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 3) 本法におけるスナック製品の定量限界（下限）及び検出限界は、従来のドライ及びセミドライ製品と同様、それぞれ0.5及び0.2 mg/kgであった。

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>.
- 3) 農林水産省：ペットフードの安全確保に関する研究会第2回配付資料，資料6，http://www.maff.go.jp/j/study/other/pet_food/index.html

2 飼料中のチオファネートの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発

奥富 幸^{*1}, 田島 麻帆^{*2}, 酒井 妙衣^{*1}, 牧野 大作^{*3}

Development of Determination Method of Thiophanate in Feed by LC-MS/MS

OKUTOMI Yuki^{*1}, TASHIMA Maho^{*2}, SAKAI Tae^{*1} and MAKINO Daisaku^{*3}

(*¹ Fukuoka Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),

*² Fukuoka Regional Center, FAMIC (Now Japan Accreditation Service for agriculture, forestry and fisheries, FAMIC),

*³ Fukuoka Regional Center, FAMIC (Now Kobe Regional Center, FAMIC))

We have developed a quantitative determination method of the concentration of thiophanate in feed using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Having added water and sodium L-ascorbate to a sample, thiophanate was extracted with methanol, and the extracted solution was filtered. The filtrate was diluted with methanol. An aliquot of the filtrate was refluxed at 120 °C for 30 minutes with copper acetate in 50 % acetic acid solution to form ethyl benzimidazole-2-ylcarbamate (EBC) by ring closure reaction. The solution was washed with *n*-hexane and the aqueous layer was adjusted to pH 6.8~6.9 with 1~10 mol/L sodium hydroxide solution. EBC was extracted with ethyl acetate, inverted into a methanol solution and then injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of EBC. LC separation was then carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and methanol as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used. Standard solution of EBC to make the calibration curve was also prepared from thiophanate by ring closure reaction.

Recovery tests were conducted on formula feed for layers, barley, maize, timothy hay, rice straw, paddy rice and whole-crop rice silage (WCRS). Thiophanate was added at different levels as following: 0.2 and 1.5 mg/kg for formula feed for layers; 0.2 and 1.2 mg/kg for barley; 0.2 and 1.5 mg/kg for maize; 3 and 20 mg/kg for timothy hay; 7 and 40 mg/kg for rice straw; 1 and 10 mg/kg for paddy rice; and 1.78 and 11.1 mg/kg for WCRS. The resulting mean recoveries ranged from 83.8 % to 116 % for EBC, excluding 122 % of paddy rice for which the recovery rate was out of target. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 10 % for EBC.

Key words: thiophanate; ethyl benzimidazole-2-ylcarbamate; ring closure reaction; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed

キーワード：チオファネート；エチル-2-ベンゾイミダゾールカルバマート；閉環反応；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

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

*² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター，現 認定センター

*³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター，現 神戸センター

1 緒 言

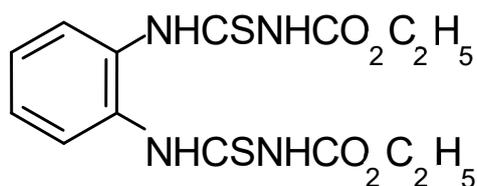
チオファネートは日本曹達が開発した野菜のウドンコ病，灰色カビ病，果樹のクロホシ病に適用されるベンズイミダゾール系殺菌剤である．日本では 1969 年に農薬として登録されたが，1974~1987 年にかけて登録が失効¹⁾し，1983 年時点で原体の製造はなくチオファネートメチルに置き換わったとされている²⁾．海外での登録状況については，2021 年時点において EU，アメリカ，カナダ等での登録は確認できていない一方で，FAO がアジア圏を対象に 2015 年に行った調査では，唯一北朝鮮において現在も登録があると報告されている³⁾．

我が国での飼料中の基準は，カルベンダジム，ベノミルをカルベンダジム含量に換算したもの，チオファネートをカルベンダジム含量に換算したもの及びチオファネートメチルをカルベンダジム含量に換算したものの総和として，えん麦，大麦，小麦，マイロ及びライ麦で 0.6 mg/kg，とうもろこしで 0.7 mg/kg，牧草で 10 mg/kg，稲わらで 20 mg/kg，稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という．）及び粃米で 5 mg/kg となっている^{4),5)}．

飼料中の分析法としては，平成 17 年度に堀米ら⁶⁾が液体クロマトグラフ質量分析計を用いた飼料中のカルベンダジム，チオファネート，チオファネートメチル及びベノミルの同時定量法を検討したが，チオファネートの回収率が目標値の 70 %を下回ったため，チオファネートを除く 3 成分の同時分析法が飼料分析基準⁷⁾に記載されている．チオファネートについては，平成 22 年度に，財団法人日本食品分析センター⁸⁾が「飼料中の有害物質等分析法開発委託事業」において，堀米らの方法を基に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（以下「JFRL 法」という．）の検討を行ったが，その平均回収率は 66.2~81.2 %となり，一部の試料において，飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という．）に定められた目標値（70~120 %）を満たしていなかった．

このため本検討では，飼料中の分析法が確立されていないチオファネートについて，JFRL 法の飼料分析基準への掲載の可否を検討したので，その概要を報告する．

参考にチオファネートの構造式を Fig. 1 に示した．



Thiophanate

ethyl *N*-[[2-(ethoxycarbonylcarbamothioylamino)phenyl]carbamothioyl]carbamate

C₁₄H₁₈N₄O₄S₂ MW: 370.5 CAS No.: 23564-06-9

Fig. 1 Chemical structure of thiophanate

2 実験方法

2.1 試 料

成鶏飼育用配合飼料，大麦，とうもろこし，チモシー乾草，稲わら及び粃米はそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し，分析用試料とした．WCRS は 60 °C で 10 時間乾

燥後，更に室内に静置して風乾した後，同様に粉碎し分析用試料とした。

なお，検討に用いた配合飼料を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed type	Ingredient type	Proportion (%)	Ingredients
For layers	Grains	53	Corn, polished white rice, paddy rice
	Oil seed meal	24	Soybean meal, rapeseed meal, linseed meal
	Brans	7	Dried distiller's grains with solubles
	Animal by-products	2	Fish meal, poultry by-product meal
	Others	14	Animal fat, Calcium carbonate, salt, calcium phosphate, citric acid, purified wood vinegar, soft chacoal powder, paprika extract, silicic anhydride, extract of marigold petal, fermented milk powder, culture of Pannier Bacillus, feed additives

2.2 試薬

1) 酢酸エチル及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは溶離液及び最終試料溶液には LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製又は関東化学製）を用い，それ以外には残留農薬・PCB 試験用を用いた。L-アスコルビン酸ナトリウム，塩化ナトリウム，塩酸，酢酸，酢酸銅（II）一水和物及び硫酸ナトリウム（無水）は試薬特級を用いた。1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。水は市販の LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製又は関東化学製）を用いた。

2) チオファネート標準原液

チオファネート標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 99.6 %）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてチオファネート標準原液を調製した（この液 1 mL は，チオファネートとして 0.5 mg を含有）。

使用に際して，この標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し，1 mL 中にチオファネートとして 400 ng を含有する検量線作成用の標準液を調製し，2.4 の 2)から 4)までの操作を試料溶液と同様に行った。その標準液の一定量をメタノールで希釈し，1 mL 中にチオファネートとして 1, 2, 10, 20, 50, 100 及び 200 ng（エチル-2-ベンゾイミダゾールカルバマート（以下「EBC」という。）として 0.554, 1.11, 2.77, 5.54, 11.1, 27.7, 55.4 及び 111 ng）を含有する検量線の各標準液を調製した。

3) EBC 標準液

EBC 標準品（林純薬工業製，純度 98.9 %）10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えて EBC 標準原液を調製した（この液 1 mL は，EBC として 0.1 mg を含有）。

使用に際して，EBC 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 EBC としてそれぞれ 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 及び 100 ng を含有する検量線作成用の各標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

1) 粉碎機：

粉碎機 1（配合飼料，大麦，とうもろこし及び粃米用）：

ZM 200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）

粉碎機 2（チモシー乾草，稲わら及び WCRS 用）：

SM 100 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，回転数（仕様）1430 rpm）

2) 振り混ぜ機：レシプロシェーカーSR-2DW タイテック製（使用時振とう数 300 rpm）

3) LC-MS/MS：

LC 部：Nexera X2 島津製作所製

MS/MS 部：LCMS-8045 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，L-アスコルビン酸ナトリウム 1 g，水 20 mL（チモシー乾草，稲わら及び WCRS の場合は 30 mL）を加え 30 分間静置後，更にメタノール 100 mL（チモシー乾草，稲わら及び WCRS の場合は 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メタノール 50 mL で洗浄し，同様に吸引ろ過した．さらに全量フラスコの標線までメタノールを加えた．成鶏飼育用配合飼料，大麦，とうもろこしは，この液を閉環反応に供する試料溶液とした．チモシー乾草，稲わら，粃米及び WCRS は，この液 2 mL を 20 mL の全量フラスコに加え，標線までメタノールを加えた液を閉環反応に供する試料溶液とした．

2) 閉環反応

試料溶液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れた．さらに，酢酸（1+1）10 mL，酢酸銅（II）一水和物 0.2 g 及び沸石を数個加え，空冷管を接続した後，120 °C の油浴上で 30 分間加熱してチオファネートを EBC に変換した後放冷した．放冷後，1 mol/L 塩酸 10 mL を空冷管の上部から加えて管壁を洗浄し，試料溶液に合わせ，液液分配 I に供する試料溶液とした．

検量線に用いる 400 ng/mL チオファネート標準液 1 mL を同様に閉環反応に供し，以降試料溶液と同様の操作を行った．

3) 液液分配 I

試料溶液をあらかじめ塩化ナトリウム 5 g を入れた 200 mL の分液漏斗 A に加え，試料溶液の入っていたなす形フラスコを 1 mol/L 塩酸 20 mL で洗浄し，洗液を試料溶液に合わせた．さらに分液漏斗 A にヘキサン 20 mL を加え，5 分間振り混ぜた後静置し，水層（下層）を 200 mL の分液漏斗 B に入れた．分液漏斗 B にヘキサン 20 mL を加え，5 分間振り混ぜた後静置し，水層（下層）を 100 mL のトールビーカーに入れ，液液分配 II に供する試料溶液とした．

4) 液液分配 II

試料溶液を 1 mol/L 及び 10 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 6.8~6.9 に調整した後，300 mL の分液漏斗 C に入れた．試料溶液の入っていたトールビーカーを酢酸エチル 50 mL で洗浄し，洗液を試料溶液に合わせた．分液漏斗 C を 5 分間振り混ぜた後静置し，水層（下層）を 300 mL の分液漏斗 D に入れ，酢酸エチル層（上層）を 200 mL の三角フラスコに入れた．分液漏

斗 D に酢酸エチル 50 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層を捨て、酢酸エチル層を先の三角フラスコに合わせた。酢酸エチル層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、300 mL のなす形フラスコにろ紙（5 種 B）でろ過した。先の三角フラスコを少量の酢酸エチルで洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液に合わせた。ろ液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。メタノール 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、上澄み液を LC-MS/MS の測定に供する試料溶液とした。

5) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各 EBC 標準液各 2 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 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), Agilent Technologies
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate-methanol (3:2) (hold for 5 min) → 5 min → (5:95) (hold for 5 min) → 0.1 min → (3:2) (hold for 8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	Air (3 L/min)
Drying gas	N ₂ (10 L/min)
Heating gas	N ₂ (10 L/min)
Interface temperature	350 °C
Heat block temperature	500 °C
Desolvation line temperature	120 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

Table 3 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>)	
Thiophanate	206	160	-	17
		-	134	20

6) 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 EBC 量を算出した。なお、本法では、チオファネートは操作中に EBC に変換されるため EBC として定量し、EBC 量に 1.806 を乗じてチオファネート量に換算した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for thiophanate in feed

2.5 添加回収試験

2.2 の 2) で調製したチオフアネート標準原液又はそれをメタノールで正確に希釈した標準液を添加に用いた。

チオフアネートとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.2 及び 1.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.005 及び 0.0375 µg/mL, EBC として 0.00277 及び 0.0208 µg/mL）、大麦に 0.2 及び 1.2 mg/kg 相当量（最終溶液中でチオフアネートとして 0.005 及び 0.03 µg/mL, EBC として 0.00277 及び 0.0166 µg/mL）、とうもろこしに 0.2 及び 1.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.005 及び 0.0375 µg/mL, EBC として 0.00277 及び 0.0208 µg/mL）、チモシー乾草に 3 及び 20 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.0075 及び 0.05 µg/mL, EBC として 0.00415 及び 0.0277 µg/mL）、稲わらに 7 及び 40 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.0175 及び 0.1 µg/mL, EBC として 0.00969 及び 0.0554 µg/mL）、粳米に 1 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.0025 及び 0.025 µg/mL, EBC として 0.00138 及び 0.0138 µg/mL）、WCRS に原物換算して 1.78 及び 11.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.01 及び 0.0625 µg/mL, EBC として 0.00554 及び 0.0346 µg/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合した後、一夜静置した後に 2.4 に従って 5 点で定量し、添加回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、WCRS への添加は風乾物試料に対してチオフアネートとして 4 及び 25 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して、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 の式により行った。

2.6 粳米における過回収の原因調査

粳米 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、2.4 の 1) に示すろ液を 200 mL の全量フラスコで定容する操作まで行い、得られた試料溶液をメタノールで 10 倍（通常の希釈倍率）、20 倍及び 40 倍に希釈し、その試料溶液 1 mL に対し、粳米の基準値である 10 mg/kg 相当量のチオフアネート（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.025 µg/mL 相当量, EBC として 0.0138 µg/mL 相当量）を添加量が 40 µL 以下になるように添加した。各試料は 2.4 の 2)~3) に従って操作後、4) に従ってろ液を約 1 mL になるまで減圧濃縮したものを 25 mL のなし型フラスコに移し、さらに酢酸エチル 2 mL で移し込みを行った後、窒素ガスを送って乾固した。メタノールを、10 倍希釈した試料には 2 mL、20 倍希釈をした試料には 1 mL、40 倍希釈をした試料には 0.5 mL をそれぞれ正確に加えて残留物を溶かした後、5000 × g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を LC-MS/MS の測定に供する試料溶液とし、EBC の回収率を比較した。なお、分析操作は 2 試験者で各濃度 1 点ずつ行った。

3 結果及び考察

3.1 JFRL 法からの変更点

JFRL 法は市販の EBC 標準品から検量線を作成しているが、その報告書において、チオフアネート標準液について閉環反応、ヘキササン洗浄及び酢酸エチル転溶を行った結果、回収率は 80.6 % だったと報告している。また、我々がこの操作を稲わら及びチモシー乾草を用いて予備検討したところ、回収率が 70 % を下回る結果が得られた。そこで、チオフアネート標準液を試料溶液と

同時に閉環反応に供し、得られた EBC 標準液を用いて検量線を作成するよう変更することにより回収率が改善した。

3.2 検量線

2.2 の 2) に従って調製した EBC 標準液各 2 μ 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 のとおりであり、EBC は 0.554~111 ng/mL (注入量として 0.00111~0.222 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、チオファネートを 0.04~8 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の濃度範囲に相当する。

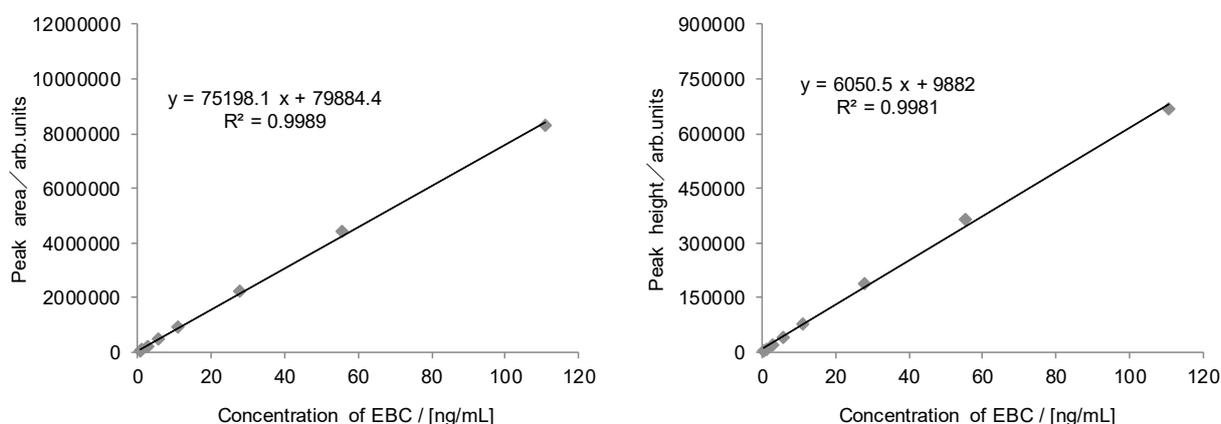


Fig. 2 Calibration curves of EBC standard by peak area (left) and height (right)

3.3 妨害物質の検討

成鶏飼育用配合飼料、大麦、とうもろこし、チモシー乾草、稲わら、粳米及び WCRS 各 1 点を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認した。その結果、一部の試料において EBC と同じ保持時間にピークが認められたが、妥当性確認法ガイドラインに定められた妨害ピークの許容範囲内であったことから、当該ピークは定量を妨害するものではないと判断した。なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

妨害ピークの許容範囲：定量下限が基準値の 1/3 以下の場合、そのピークの面積（又は高さ）が、基準値に相当するピーク面積（又は高さ）の 1/10 未満（ただし、定量下限濃度に相当するピーク面積（又は高さ）を超えないこと。）。

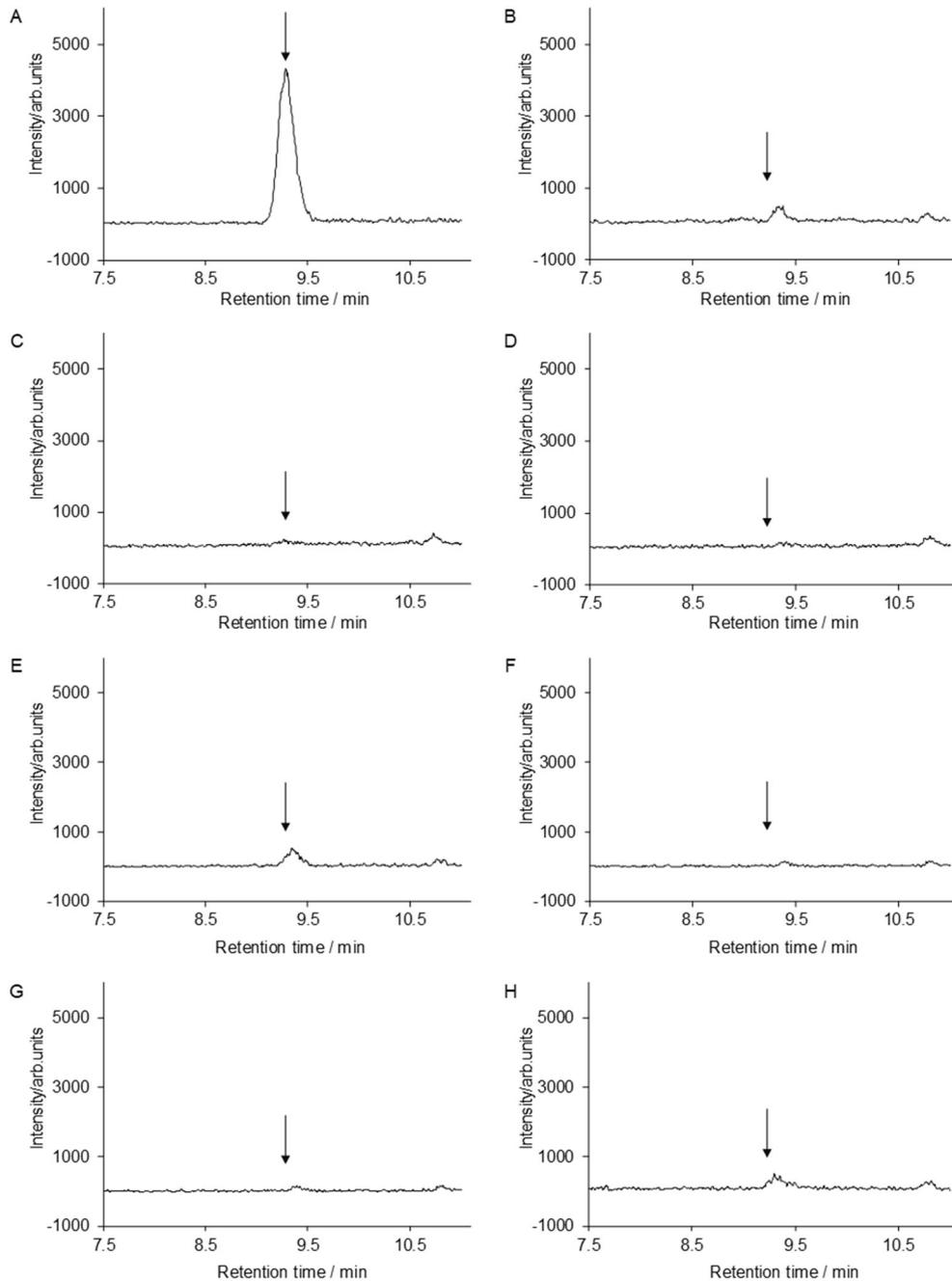


Fig. 3 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of EBC in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of EBC)

A: Standard solution (0.5 ng/mL: 0.001 ng as EBC)

B~H: Sample solutions (B: Formula feed for layer, C: Barley, D: Maize, E: Timothy, F: Rice straw, G: Paddy rice, H: WCRS)

3.4 マトリックス効果の確認

2.4の1)~4)により調製した成鶏飼育用配合飼料，大麦，とうもろこし，チモシー乾草，稲わら，粳米及びWCRSのブランク試料溶液にチオファネートとしてそれぞれ1.44，1.44，1.44，21.7，39.7，10.8及び21.7 mg/kg相当量（最終試料溶液でチオファネートとしてそれぞれ0.036，0.036，

0.036, 0.054, 0.099, 0.027 及び 0.054 μ g/mL 相当量, EBC としてそれぞれ 20, 20, 20, 30, 55, 15 及び 30 ng/mL 相当量) の EBC を添加した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 EBC 標準液に対するピーク面積比を確認した.

その結果は Table 4 のとおりであり, 試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく定量が可能であった.

Table 4 Matrix effect study

Samples	Concentration of thiophanate		Matrix effect ^{b)} (%)
	Matrix standard solution (ng/mL)	Sample ^{a)} (mg/kg air dry-basis)	
Formula feed for layers	20	1.44	93.4
Barley	20	1.44	99.6
Maize	20	1.44	98.2
Timothy	30	21.7	96.1
Rice straw	55	39.7	106
Paddy rice	15	10.8	103
WCRS	30	21.7	95.4

$n = 1$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of EBC in the presence of matrix to that in the absence of matrix

3.5 添加回収試験

2.5 に従って添加回収試験を実施した. その結果は Table 5 のとおり, 成鶏飼育用配合飼料, 大麦, とうもろこし, チモシー乾草, 稲わら及び WCRS については平均回収率 83.8~116 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) としては 10 %以下であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた. 本法と JFRL 法での結果を比較した結果, いずれの試料においても回収率が改善した. 一方, 粳米については, 平均回収率が 77.0~122 %, RSD_r が 8.2 %以下となり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値をわずかに満たさない結果が得られた.

1) 真度: 70 %以上 120 %以下

2) 併行精度: 20 %以下 (添加濃度 0.2 mg/kg), 16 %以下 (同 1 及び 1.2 mg/kg), 15 %以下 (同 1.5 mg/kg), 14 %以下 (同 3 mg/kg), 13 %以下 (同 4 mg/kg), 12 %以下 (同 7 mg/kg), 11 %以下 (同 10 mg/kg), 10 %以下 (同 20 及び 25 mg/kg), 9 %以下 (同 40 mg/kg).

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 Recoveries of EBC from spiked feeds

Feed types	Spiked level (mg/kg as fed basis)	Our method		JFRL method	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Formula feed for layers	0.2	99.1	10	75.8	10
	1.5	110	4.4	109	4.6
Barley	0.2	99.6	3.6	77.8	3.4
	1.2	116	4.8	88.6	4.6
Maize	0.2	83.8	2.9	71.0	2.7
	1.5	101	4.0	85.4	4.1
Timothy	3	87.2	3.7	70.8	3.8
	20	95.4	3.2	72.6	3.1
Rice straw	7	95.2	7.7	71.0	7.9
	40	91.5	2.7	45.2	2.8
Paddy rice	1	77.0	8.2	63.0	7.5
	10	122	7.4	75.0	8.0
WCRS ^{c)}	1.78	94.4	2.8	86.2	2.7
	11.1	108	2.4	91.9	2.5

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Thiophanate were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spike levels were 4 and 25 mg/kg as air-dry basis for thiophanate. The levels of thiophanate as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

The levels of pesticides as fed basis (moisture 60 %)

= the levels of pesticides as air-dry basis (moisture 10 %) / 2.25

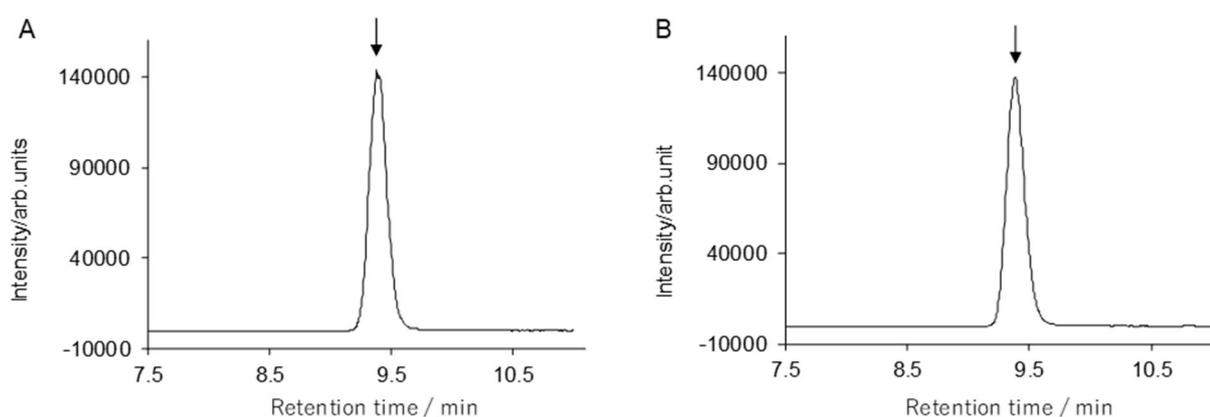


Fig. 4 Typical SRM chromatograms of EBC in standard and spiked sample solution (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of EBC.)

A: Standard solution (55.4 ng/mL: 0.111 ng as EBC)

B: Sample solution of rice straw (spiked at 40 mg/kg as thiophanate (22.2 mg/kg: 0.111 ng as EBC))

3.6 定量下限及び検出下限

妥当性確認法ガイドラインに定められた定量下限の目標値（基準値に対して 1/5）以下の濃度（成鶏飼育用配合飼料，大麦及びとうもろこしは 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.005 ng/mL 相当量），チモシー乾草は 3 mg/kg 相当量（同 0.0075 ng/mL 相当量），稲わらは 7 mg/kg 相当量（同 0.0175 ng/mL 相当量）並びに WCRS（風乾物中）で 4 mg/kg 相当量（同 0.01 ng/mL 相当量））における添加回収試験の結果，得られたピークの SN 比が 10 以上であったため，これらをチオファネートの定量下限とした．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．

本法の検出下限を確認するため，添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた．その結果，検出下限は成鶏飼育用配合飼料，大麦及びとうもろこしで 0.06 mg/kg，チモシー乾草で 0.9 mg/kg，稲わらで 2 mg/kg 及び WCRS（風乾物中）で 1 mg/kg であり，同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（基準値に対して 1/10 以下）を満たしていた．

3.7 粳米における過回収の原因調査

3.5 において，粳米を用いて高濃度側の添加回収率を確認した際に過回収（122%）となったことについて，原因を調査した．3.4 より LC-MS/MS 測定時のイオン化促進は起こっておらず，また，標準液は試料溶液と同じ操作を行っており操作上の影響は相殺されていると考えられることから，試料溶液に含まれる成分による閉環反応の促進が原因ではないかと考えられた．そこで，粳米のブランク試料を用いて 2.6 に従い，閉環反応に供する試料溶液の希釈による回収率への影響を確認した．その結果は Table 6 のとおり，20 倍及び 40 倍希釈において過回収が改善され，また 40 倍希釈の方が良好な結果が得られた．

Table 6 Effect of sample solution volume for ring closure reaction on EBC recovery

Examiner	Recovery (%)		
	10-fold dilution (original rate)	20-fold dilution	40-fold dilution
A	110	86.5	93.3
B	105	82.2	100

$n = 1$

4 まとめ

飼料中に残留するチオファネートについて，JFRL 法を基に，LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への収載の可否について検討したところ，チオファネートを試料と同時に閉環反応させて得た EBC を検量線に用いる方法に変更することで，以下の結果が得られた．

- 1) 検量線は EBC として 0.554~111 ng/mL 相当量（注入量として 0.001~0.22 ng 相当量）の範囲で直線性を示した．なお，当該検量線の濃度範囲は，チオファネートを 0.04~8 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の濃度範囲に相当する．
- 2) 成鶏飼育用配合飼料，大麦，とうもろこし，チモシー乾草，粳米，稲わら及び WCRS 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) 本法に従って得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果，試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく定量が可能であった．

- 4) チオファネートとして、成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしに 0.2 及び 1.5 mg/kg, 大麦に 0.2 及び 1.2 mg/kg, チモシー乾草に 3 及び 20 mg/kg, 稲わらに 7 及び 40 mg/kg 相当量を, 粳米に 1 及び 10 mg/kg 相当量を, WCRS に原物換算して 1.78 及び 11.1 mg/kg 相当量をそれぞれ添加し, 本法に従って 5 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, 粳米の高濃度側において妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値を超過する結果となり, その他については, 真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた.
- 5) 本法の定量下限及び検出下限は, チオファネートとして, 成鶏飼育用配合飼料, 大麦及びとうもろこしでそれぞれ 0.2 及び 0.06 mg/kg, チモシー乾草で 3 及び 0.9 mg/kg, 稲わらで 7 及び 2 mg/kg であった. また WCRS では風乾物中で 4 及び 1 mg/kg であった. 設定した定量下限及び検出下限は, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた.
- 6) 粳米における, 妥当性確認法ガイドラインに示す真度の目標値を超過した原因を調査したところ, 閉環反応に供する試料溶液を 20 倍及び 40 倍希釈することにより過回収が改善され, また 40 倍希釈の方が良好な結果が得られた.

文 献

- 1) 農林水産消費安全技術センター：登録・失効農薬情報，失効農薬一覧，<http://www.acis.famic.go.jp/toroku/>, cited 25th Jan. 2022
- 2) 植村 振作, 河村 宏, 辻万 千子, 富田 重行, 前田 静夫：農薬毒性の事典，三省堂 (1988) (ISBN: 4-385-35605-X) .
- 3) FAO: Progress in pesticide risk assessment and phasing-out of highly hazardous pesticides in Asia, RAP publication 2015/01, Bangkok, Thailand (2015).
- 4) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 5) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 6) 堀米 明日香, 野崎 友春：飼料中のカルベンダジム, チオファネート, チオファネートメチル及びベノミルの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法，飼料研究報告，32, 30-44 (2007).
- 7) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 8) 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開発委託事業（飼料中の有害物質等の分析法の開発）報告書，平成 23 年 1 月 (2011).

3 飼料中のジクワット及びパラコート 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分析法の開発

榊原 良成^{*1}, 伊澤 淳修^{*1}, 桑原 正良^{*1}, 高橋 雄一^{*2}, 保田 伊世^{*3}, 青山 幸二^{*3}

Development of Simultaneous Determination Method of Diquat and Paraquat in Feed by LC-MS/MS

SAKAKIBARA Yoshinari^{*1}, IZAWA Atsunobu^{*1}, KUWABARA Masayoshi^{*1}, TAKAHASHI Yuichi^{*2},
YASUDA Iyo^{*3} and AOYAMA Koji^{*3}

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

^{*2} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Sapporo Regional Center, FAMIC),

^{*3} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have developed a simultaneous quantitative determination method of the concentration of diquat and paraquat in feed using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Diquat and paraquat were extracted with water and sulfuric acid by heating under reflux, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then purified with two types of solid phase extraction (SPE) columns (Oasis MCX and Oasis MAX, Waters Co.; Milford, MA, USA). Having oxidized these compounds, the sample solution was purified with an SPE column (Oasis HLB, Waters Co.), and injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of diquat and paraquat. LC separation was then carried out on an ODS column (Inertsil ODS-3, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 4 μm, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 0.1 v/v% formic acid solution and methanol as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Soak washing of the used glassware with NaOH solution (1 mol/L) and nitric acid (1:10) was necessary, because diquat and paraquat have a strong tendency to remain on glassware. Of the feeds used in the present experiment, the matrix effect identified on milo and corn was successfully removed by diluting the sample solution to be injected into an LC-MS/MS.

Key words: diquat; paraquat; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed

キーワード：ジクワット；パラコート；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料

1 緒 言

ジクワット及びパラコートは、Imperial Chemical Industries 社（現 Syngenta 社）により開発された非選択性接触型のピピリジリウム系除草剤であり、植物の光合成により、ジクワットでは過酸化物が、パラコートでは活性酸素が発生し、植物細胞を破壊することで除草効果を示すと考えられている^{1),2)}。

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 札幌センター

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

ジクワットは、我が国では 1963 年に初回農薬登録されており、飼料中の基準値³⁾としては、えん麦、小麦及びマイロで 2 mg/kg、大麦で 5 mg/kg、とうもろこしで 0.05 mg/kg、ライ麦で 0.03 mg/kg、牧草で 100 mg/kg が設定されている。飼料中の管理基準値⁴⁾としては、稲わら及び稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で 0.05 mg/kg が設定されている。

パラコートは、我が国では 1965 年に初回農薬登録されており、飼料中の基準値³⁾としては、えん麦及びマイロで 0.5 mg/kg、大麦、小麦及びライ麦で 0.05 mg/kg、とうもろこしで 0.1 mg/kg、牧草で 5 mg/kg が設定されている。飼料中の管理基準値⁴⁾としては、稲わらで 0.3 mg/kg、WCRS で 0.05 mg/kg が設定されている。

飼料中のジクワット及びパラコートの分析法としては、飼料分析基準⁵⁾において液体クロマトグラフによる個別分析法が記載されているが、定量下限と基準値が一致するものがあり、また、発がんのおそれがあるクロロホルムを使用することから、分析法の改良が急務となっている。

このため今回、一般財団法人日本食品分析センターが「平成 28 年度飼料中の農薬分析法開発委託事業」において開発した飼料中のジクワット及びパラコート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⁶⁾（以下「JFRL 法」という。）について、飼料分析基準への記載の可否を検討したので、その概要を報告する。

なお、飼料分析基準では、単にジクワットと記載した場合はジクワット二臭化物を、またパラコートと記載した場合はパラコート二塩化物を指すと規定されていることから、本検討内でもジクワット又はパラコートと記載した場合には同様の扱いとした。

参考にジクワット及びパラコートの構造式等を Fig. 1 に示した。

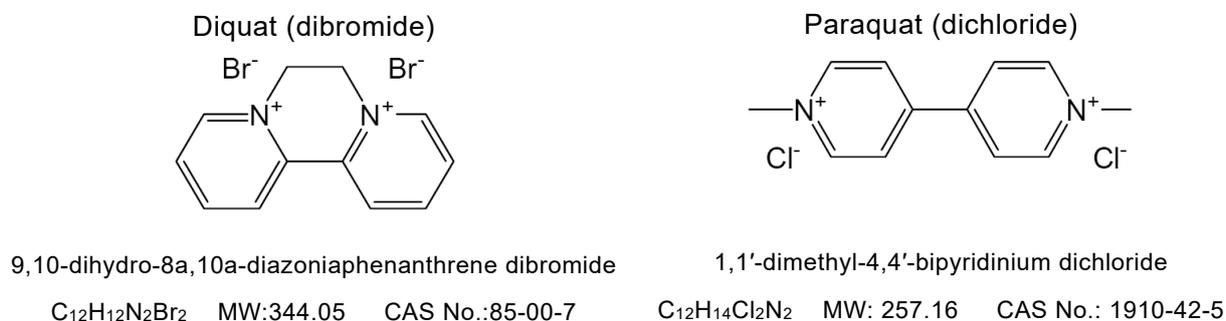


Fig. 1 Chemical structures of diquat and paraquat

2 実験方法

2.1 試料

えん麦、大麦、マイロ、小麦、とうもろこし、乾牧草（アルファルファ乾草及びライグラス乾草）及び稲わらは目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し、分析用試料とした。WCRS は 60 °C で 10 時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉碎し分析用試料とした。

2.2 試薬

1) アセトニトリルは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは残留農薬・PCB 試験用（LC-MS/MS の溶離液のみ LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製））を用いた。ギ酸（質量分率 99 %）は LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。塩化アンモニウム、塩酸、水酸

化ナトリウム、フェリシアン化カリウム及び硫酸は試薬特級を用いた。水は Milli-Q Integral 5 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。

2) ジクワット標準原液

二臭化ジクワット一水和物標準品 (富士フイルム和光純薬製, 純度 99.0 %) 26.31 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, 塩酸 (0.01 mol/L) を加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてジクワット標準原液を調製した (この液 1 mL は, ジクワットとして 0.5 mg を含有)。

3) パラコート標準原液

パラコートジクロリド標準品 (富士フイルム和光純薬製, 純度 98.0 %) 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, 塩酸 (0.01 mol/L) を加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてパラコート標準原液を調製した (この液 1 mL は, パラコートとして 0.5 mg を含有)。

4) 混合標準原液

ジクワット標準原液 1 mL 及びパラコート標準原液 1 mL を 25 mL の全量フラスコに入れて混合し, 更に標線まで塩酸 (0.01 mol/L) を加えて混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, ジクワット及びパラコートとして各 20 µg を含有)。

2.3 装置及び器具

1) 粉碎機 :

粉碎機 1 (えん麦, 大麦, マイロ, 小麦, とうもろこし用) :

ZM 200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)

粉碎機 2 (乾牧草, 稲わら及び WCRS 用) :

SM 100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1430 rpm)

2) 強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム (以下「MAX ミニカラム」という。) : Oasis MAX (500 mg) Waters 製

3) 強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム (以下「MCX ミニカラム」という。) : Oasis MCX (500 mg) Waters 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 (以下「HLB ミニカラム」という。) : Oasis HLB (60 mg) Waters 製

5) メンブランフィルター : 13HP045AN (孔径 0.45 µm, 直径 13 mm, ポリテトラフルオロエチレン) 東洋濾紙製

6) LC-MS/MS :

LC-MS/MS 1 (2.5 の検討に使用)

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS/MS 部 : Xevo TQD Waters 製

LC-MS/MS 2 (2.5 以外の検討に使用)

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 のなす形フラスコに入れ、水 60 mL 及び硫酸 30 mL を加え、空冷管を付け 120 °C の油浴で 60 分間加熱還流して抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、放冷後の抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後、先のなす形フラスコ及び残さを順次水 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。さらに、全量フラスコの標線まで水を加えた。この液 2 mL（乾牧草は、更に硫酸（3 mol/L）で正確に 25 倍希釈した後、その液 2 mL）をポリプロピレン製ビーカーに正確に分取し、水 30 mL を加え、水酸化ナトリウム溶液（12 mol/L）で pH 5.5~6.5 に調整した後、50 mL 程度となるよう水を加え、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

2) カラム処理 I

MAX 及び MCX ミニカラムをそれぞれメタノール 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄し、MAX ミニカラムの下に MCX ミニカラムを連結した。試料溶液を連結ミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下（必要に応じて流速が 1 mL/min 程度になるよう吸引した。以下同様。）した。試料溶液の入っていたポリプロピレン製ビーカーを水 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次連結ミニカラムに加え、同様に流出させた。

MAX ミニカラムをはずし、10 mL ポリプロピレン製全量フラスコを MCX ミニカラムの下に置き、塩化アンモニウム溶液（25 w/v%）9 mL を MCX ミニカラムに加えて同様に流下し、ジクワット及びパラコートを溶出させた。さらに標線まで塩化アンモニウム溶液（25 w/v%）を加え、酸化に供する試料溶液とした。

3) 酸化

試料溶液 2 mL をあらかじめ水酸化ナトリウム溶液（12 mol/L）10 mL 及びフェリシアン化カリウム溶液（1 w/v%）1 mL を入れ混合したポリプロピレン製ビーカーに正確に加えてかき混ぜ、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

4) カラム処理 II

HLB ミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、試料溶液の入っていたポリプロピレン製ビーカーを水 10 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下した。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル 5 mL をミニカラムに加えて同様に流下し、ジクワット及びパラコートを溶出させた。

溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。水-メタノール（4+1）1 mL（乾牧草は 4 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。

5) 標準液の酸化及びカラム処理

混合標準原液 1 mL を 20 mL の全量フラスコに入れ、標線まで塩酸（0.01 mol/L）を加えて酸化用混合標準液を調製した（この液 1 mL は、ジクワット及びパラコートとして各 1 µg を含有）。酸化用混合標準液 0.1 mL 及び塩化アンモニウム溶液（25 w/v%）2 mL をあらかじめ水酸化ナトリウム溶液（12 mol/L）10 mL 及びフェリシアン化カリウム溶液（1 w/v%）1 mL を入れ混合したポリプロピレン製ビーカーに正確に加えた。以下 3)及び 4)の操作を試料溶液と同様

に行った後、水-メタノール (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中にジクワット及びパラコートとして 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 及び 20 ng 相当量を含む各混合標準液を調製した。

6) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各混合標準液各 10 μ 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。なお、検討途中に LC-MS/MS が故障したため、2 台の装置を使用した。各装置の測定条件を Table 1 及び 2 に示した。

Table 1-1 Operation conditions of LC-MS/MS 1

Column	Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 4 μ m), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% formic acid aqueous solution – methanol (4:1) \rightarrow 10 min \rightarrow (3:7) (hold for 2 min) \rightarrow 5 min \rightarrow (4:1)
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 ₂ (800 L/h, 400 $^{\circ}$ C)
Capillary voltage	0.6 kv
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.1 mL/min)

Table 1-2 MS/MS parameters of LC-MS/MS 1

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>)		
Diquat oxide	215	171	—	30	19
		—	153	30	28
Paraquat oxide	217	174	—	39	25
		—	104	39	48

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

Column	Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 4 μ m), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% formic acid aqueous solution – methanol (4:1) \rightarrow 10 min \rightarrow (3:7) (hold for 2 min) \rightarrow 5 min \rightarrow (4:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	Air (3 L/min)
Drying gas	N ₂ (15 L/min)
Heat block temperature	500 $^{\circ}$ C
Desolvation line temperature	100 $^{\circ}$ C

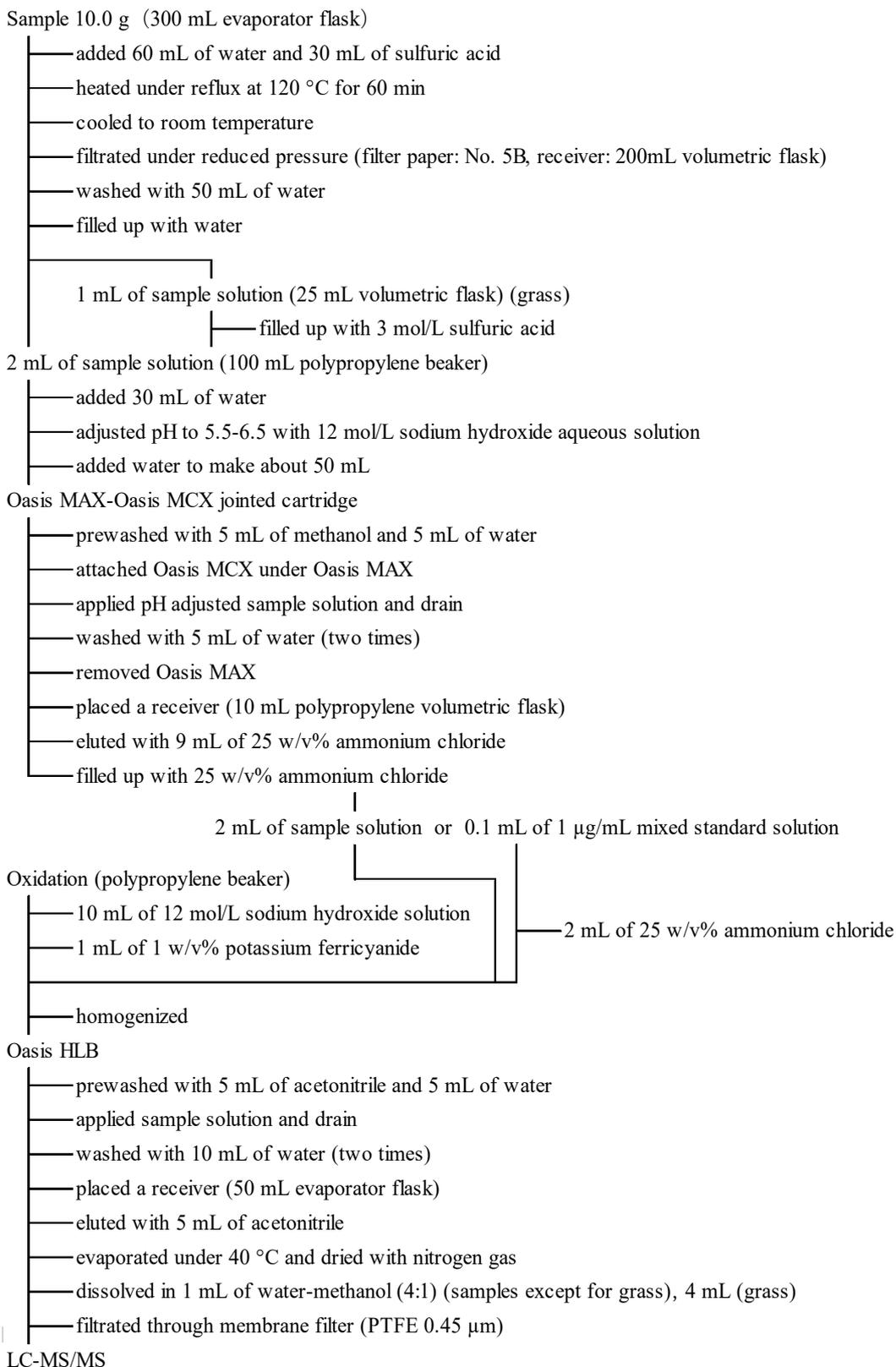
Table 2-2 MS/MS parameters of LC-MS/MS 2

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
Diquat oxide	215	171	—	25
		—	153	10
Paraquat oxide	217	174	—	31
		—	104	45

7) 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、試料中のジクワット量及びパラコート量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for diquat and paraquat in feed

2.5 ジクワット及びパラコートの残留及び洗浄方法の検討

使用するガラス器具を以下の 1), 2)及び 2) + 3) の 3 通りの方法で洗浄等を行い, それぞれの

ガラス器具を用いて 2.4 に従い、試料を用いずに試験を実施した。

- 1) 全てのガラス器具を、新しいもの（もしくは本実験で使用していないもの）を用いた。
- 2) 2.4 の 1)で抽出に用いる 300 mL なす形フラスコを、水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）による漬け置き洗浄（約 15 分間）して用いた。
- 3) 全てのガラス器具を、硝酸（1+10）に一晩漬け置き洗浄して用いた。

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.4 の 5)により調製した各混合標準液各 10 μ 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 のとおりであり、ジクワット及びパラコート各 0.1~20 ng/mL（注入量として 0.001~0.2 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、ジクワット及びパラコートを 0.005~1 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する。

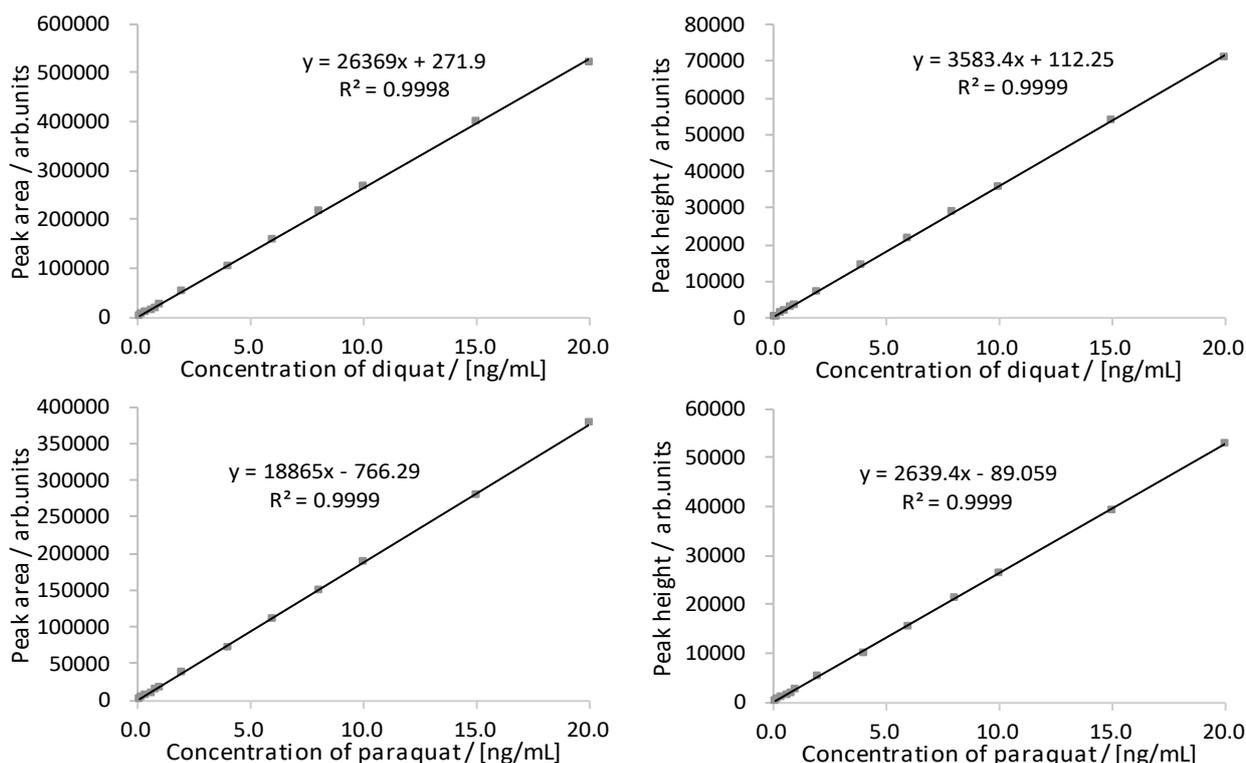


Fig. 2 Calibration curves of diquat and paraquat by peak area (left) and peak height (right)

3.2 ジクワット及びパラコートの残留及び洗浄方法の検討

2.4 の 1)から 4)により調製した各試料（えん麦、大麦、マイロ、小麦、とうもろこし、アルファアルファ乾草、ライグラス乾草、稲わら及び WCRS）のブランク試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認した。その結果、測定したほぼ全ての飼料原料からジクワット（0.00~0.61 ng/mL）及びパラコート（0.02~0.68 ng/mL）が検出されたため、試料を用いずに試験を行い確認したところ、Fig. 3 のとおりジクワット及びパラコートが検出（0.34~0.83

ng/mL) された。このため、ジクワット及びパラコートのガラス器具への吸着を疑い、2.5 に従い空試験を実施することで原因究明及びガラス器具の洗浄方法の検討を行った。

その結果、Table 3 のとおり 2.5 の 2) を実施した場合にだけジクワット及びパラコートが検出された。このことから、ジクワット及びパラコートは、洗剤や超音波による洗浄のみではガラス器具へ残留してしまうが、硝酸による漬け置き洗浄を行うことで残留を除去できることを確認した。このため、試験に使用するガラス器具については、2.4 の 1) の硫酸での抽出操作によるなす形フラスコの汚れを落とすために行っているアルカリ洗浄と合わせ、アルカリ及び硝酸による漬け置き洗浄を実施することとした。

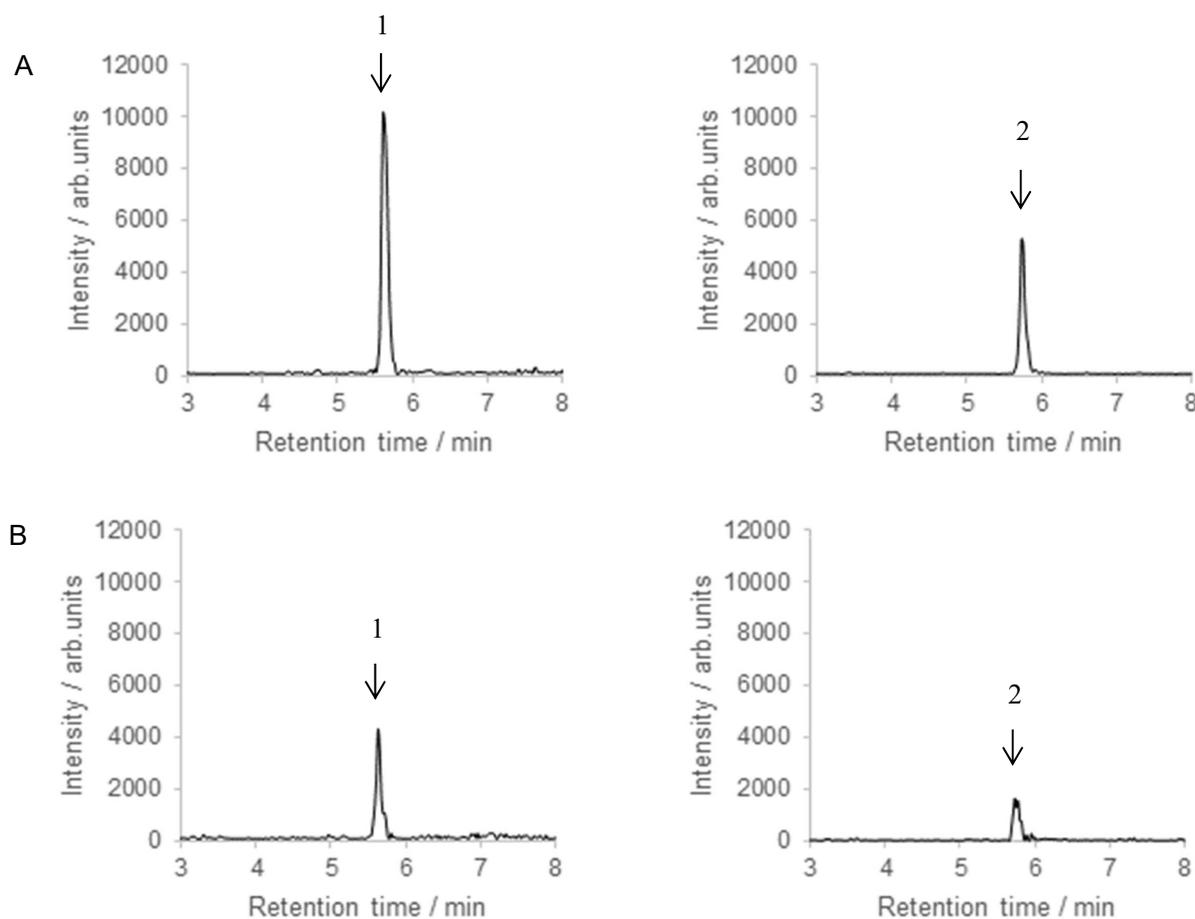


Fig. 3 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of diquat oxide and paraquat oxide in standard and reagent blank solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the retention times of 1: diquat oxide and 2: paraquat oxide)

A: Standard solution (The oxidative product of 1 ng/mL each as diquat and paraquat)

B: Reagent blank

Table 3 Cleaning method study

No	Cleaning method			Blank test results
	New glassware ^{a)}	Alkaline treatment ^{b)}	Nitric acid treatment ^{c)}	
1	○	—	—	Not detected
2	—	○	—	Detected
3	—	○	○	Not detected

$n = 1$, ○: Tested, —: Not tested

a) About all glassware to use, the new glassware (or the one which haven't been used by this experiment) was used.

b) 300 mL evaporator flask for extraction which was soaked by NaOH (1 mol/L) for about 15 minutes was used.

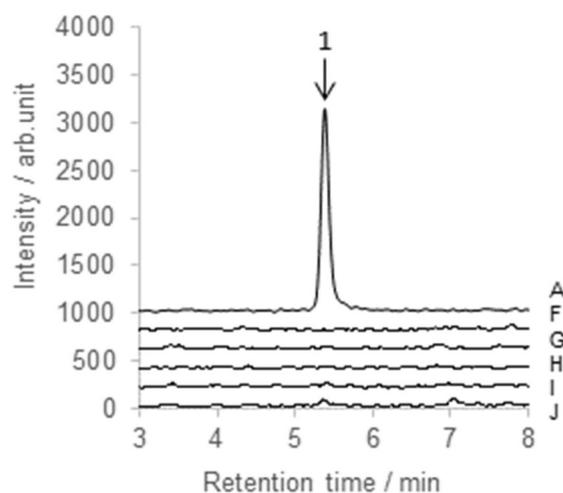
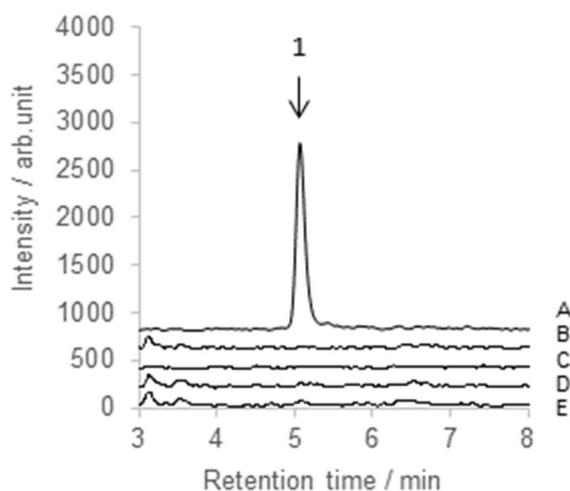
c) About all glassware to use, the glassware which was soaked in nitric acid (1:10) for one night was used.

3.3 妨害物質の検討

2.4 の 1)から 4)により調製した各試料（えん麦，大麦，マイロ，小麦，とうもろこし，アルファルファ乾草，ライグラス乾草，稲わら及び WCRS）の試料溶液を LC-MS/MS に注入し，得られた SRM クロマトグラムを確認した．その結果，いずれの試料においてもジクワット及びパラコート定量を妨げるピークは認められなかった．なお，WCRS においてジクワットと，またとうもろこし及び小麦を除く試料でパラコートと同じ保持時間にピークが認められたが，マイロ以外のピークは，妥当性ガイドラインに定められた妨害ピークの許容範囲内（基準値に相当するピーク面積の 1/10 未満）であった．マイロのピークについては，定量イオンと確認イオンの面積比を確認したところ標準液と同等であること及び当該マイロの産地であるアルゼンチンでのパラコートの使用状況⁷⁾から，パラコート（試料中濃度 0.02 mg/kg）であると判断した．

なお，得られた SRM クロマトグラムを Fig. 4 に示した．

Diquat oxide



Paraquat oxide

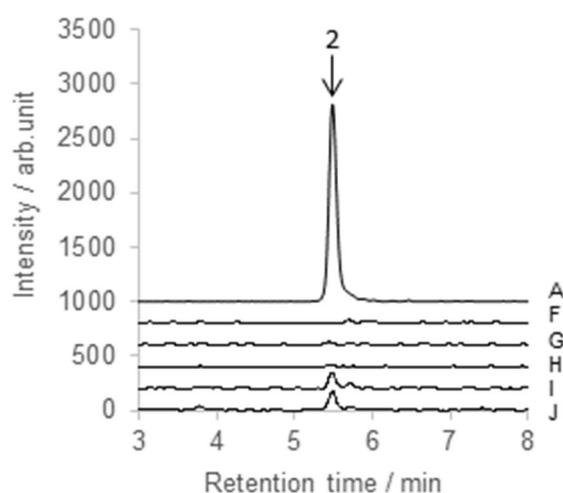
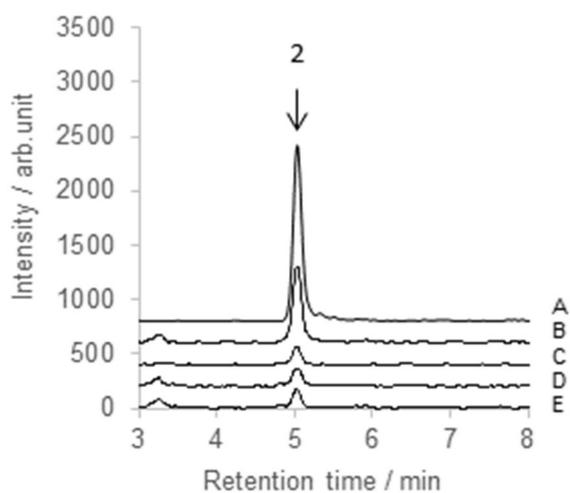


Fig. 4 Typical SRM chromatograms of diquat oxide and paraquat oxide in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention times of 1: diquat oxide and 2: paraquat oxide. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (The oxidative product of 1 ng/mL each as diquat and paraquat),

B~J: Blank sample solution (B: milo, C: alfalfa hay, D: barley, E: oats, F: wheat, G: corn, H: ryegrass hay, I: rice straw and J: WCRS)

3.4 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 4)により調製した各試料 (えん麦, 大麦, マイロ, 小麦, とうもろこし, アルファルファ乾草, ライグラス乾草, 稲わら及び WCRS) のブランク試料溶液に, 各試料の基準値相当量 (基準値が検量線最大濃度 20 ng/mL 以上の場合 10 ng/mL) のジクワット及びパラコート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)から 4)及び 2.4 の 5)に従って調製した同濃度の各農薬標準液に対するピーク面積比を確認した. その結果, Table 4 のとおりであり, とうもろこし及びマイロにおいて, イオン化を阻害するマトリックス効果が認められた. そこで, 最終試料溶液を水-メタノール (4+1) で 2 倍希釈して測定したところ, イオン化阻害を

抑制し試料マトリックスの影響を受けることなく定量が可能であった。

Table 4 Matrix effect study

Samples	Concentration				Matrix effect ^{b)}	
	Matrix standard solution (ng/mL)		Sample ^{a)} (mg/kg air-dry basis)		Matrix effect ^{b)} (%)	
	Diquat	Paraquat	Diquat	Paraquat	Diquat	Paraquat
Oats	10	10	0.5	0.5	99.2	100
Barley	10	1	0.5	0.05	97.5	96.2
Milo	10	10	0.5	0.5	62.6	56.4
Wheat	10	1	0.5	0.05	98.1	99.0
Corn	1	2	0.05	0.1	69.7	67.3
Alfalfa hay	10	1	50	5	99.9	97.5
Ryegrass hay	10	1	50	5	98.0	97.9
Rice straw	1	6	0.05	0.3	90.9	92.6
WCRS	2.25	2.25	0.1125	0.1125	96.8	103
Milo (two times dilution) ^{c)}	10	10	0.5	0.5	98.2	103
Corn (two times dilution) ^{c)}	1	2	0.05	0.1	98.1	105

$n = 1$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of pesticides in the presence of matrix to that in the absence of matrix

c) Blank solution (milo and corn) diluted by water-methanol (4:1)

4 まとめ

飼料中のジクワット及びパラコートについて、JFRL法を基に、LC-MS/MSを用いた同時定量法について、飼料分析基準への収載の可否を検討したところ、以下の結果が得られた。

1) 検量線は、ジクワット及びパラコート各 0.1~20 ng/mL 相当量（注入量として 0.001~0.2 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、ジクワット及びパラコートを 0.005~1 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する。

2) ジクワット及びパラコートは、ガラス器具への吸着が強く、洗剤や超音波による洗浄方法では残留しやすいことから、使用の都度、ガラス器具のアルカリ及び硝酸による洗浄が必要であった。

3) 今回用いた試料について、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) 本法に従って得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、マイロ及びとうもろこしにおいてイオン化阻害が見られたが、最終試料溶液を 2 倍希釈することでイオン化阻害を抑制し、試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく定量可能であった。

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，令和元年 10 月 8 日，府食 368 号 (2019).
- 2) 水域の生活環境動植物の被害防止に係る農薬登録基準：評価書（水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料 パラコートジクロリド（パラコート））
- 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，農林省令第 35 号，昭和 51 年 7 月 24 日 (1976).
- 4) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 6) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 28 年度飼料中の農薬分析法開発委託事業報告書，平成 29 年 3 月 (2017).
- 7) SUMITOMO CHEMICAL Latin America : <https://www.sumitomochemical.com/asd/ar-en/herbicides-argentina/paraquat-276/>, cited 22 Mar. 2022.

4 飼料用稲中のベンスルフロンメチルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発

武田 然也*, 船木 紀夫*, 関口 好浩*

Development of Determination Method of Bensulfuron-Methyl in Rice Straw, Whole-Crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

TAKEDA Zenya*, FUNAKI Norio* and SEKIGUCHI Yoshihiro*

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

We have developed a quantitative determination method of the concentration of bensulfuron-methyl in rice straw, whole-crop rice silage (WCRS) and paddy rice for feed using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS). In addition, the application of azimsulfuron, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron for a simultaneous determination method with bensulfuron-methyl was examined.

Having added water to a sample, azimsulfuron, bensulfuron-methyl, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron were extracted with acetone, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then diluted with acetone. The diluted solution was purified with two types of solid phase extraction columns (InertSep K-solute, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan and ENVI-Carb, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA), and injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of azimsulfuron, bensulfuron-methyl, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron. LC separation was then carried out on an ODS column (Mightysil RP-18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Kanto Chemical Co., Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and methanol as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on rice straw, WCRS and paddy rice. Azimsulfuron, bensulfuron-methyl, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron were added at the levels of 0.01 and 0.2 mg/kg for rice straw, 0.004 and 0.09 mg/kg for WCRS, and 0.01 and 0.2 mg/kg for paddy rice respectively. The resulting mean recoveries ranged as following: 65.1 % to 84.7 % for azimsulfuron; 88.4 % to 102 % for bensulfuron-methyl; 88.8 % to 105 % for cyclosulfamuron; 84.9 % to 91.2 % for ethoxysulfuron; 78.4 % to 87.9 % for flucetosulfuron; 60.9 % to 87.9 % for halosulfuron-methyl; and 62.5 % to 74.5 % for imazosulfuron. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was as following: less than 14 % for azimsulfuron; less than 5.3 % for bensulfuron-methyl; less than 7.1 % for cyclosulfamuron; less than 8.8 % for ethoxysulfuron; less than 18 % for flucetosulfuron; less than 15 % for halosulfuron-methyl; and less than 14 % for imazosulfuron.

Key words: bensulfuron-methyl; azimsulfuron; cyclosulfamuron; ethoxysulfuron; flucetosulfuron; halosulfuron-methyl; imazosulfuron; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice straw; whole-crop rice silage; paddy rice

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

キーワード：アジムスルフロン；ベンスルフロロンメチル；シクロスルファミロン；エトキシスルフロン；フルセトスルフロン；ハロスルフロロンメチル；イマゾスルフロン；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；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米

1 緒 言

ベンスルフロロンメチルは、DuPont de Nemours（米国）により開発されたスルホニルウレア系除草剤であり、ノビエを除く主要な水田雑草に卓効を示す¹⁾。我が国では1987年に農薬登録されており、飼料中の管理基準値²⁾として、稲わらで0.1 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で0.05 mg/kgと設定されているが、その分析法は飼料分析基準³⁾に記載されていない。

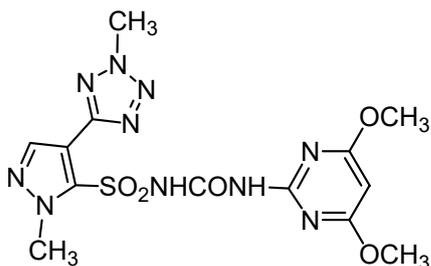
このため今回、一般財団法人日本食品分析センターが「平成25年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業」において開発した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）を用いたアジムスルフロン、イマゾスルフロン、エトキシスルフロン、シクロスルファミロン及びベンスルフロロンメチルの同時定量法⁴⁾（以下「JFRL法」という。）を基に、飼料用稲（稲わら、WCRS及び粃米）中のベンスルフロロンメチルを対象に飼料分析基準への記載の可否を検討した。

なお、アジムスルフロン、イマゾスルフロン、エトキシスルフロン、シクロスルファミロン及びフルセトスルフロンについては管理基準値が定められていないため本検討課題の主目的とする成分ではないが、ベンスルフロロンメチルと同様のスルホニアウレア系除草剤であり、同じ分析法を適用できる可能性が高いことから、同時定量法としての適用を併行して検討した。フルセトスルフロンについては、平成27年に一般財団法人日本食品分析センターによりJFRL法への適用の妥当性が確認されている⁵⁾。

さらに、管理基準値として稲わらで0.2 mg/kg、WCRSで0.1 mg/kgと設定されており、平成21年にJFRL法とは異なる方法⁶⁾が開発されているハロスルフロロンメチルについても、上述の農薬と同じスルホニルウレア系除草剤であることから、同時定量法の適用の可能性を検討した。

参考に各農薬の構造式等をFig. 1に示した。

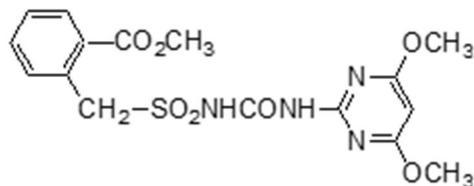
Azimsulfuron



1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-[1-methyl-4-(2-methyl-2H-tetrazol-5-yl)pyrazol-5-ylsulfonyl]urea

C₁₃H₁₆N₁₀O₅S MW: 424.4 CAS No.: 120162-55-2

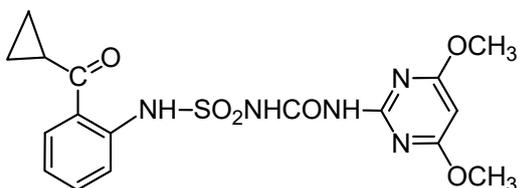
Bensulfuron-methyl



Methyl α -(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)carbamoylsulfamoyl)-*o*-toluate

C₁₆H₁₈N₄O₇S MW: 410.4 CAS No.: 83055-99-6

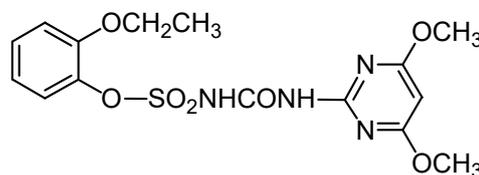
Cyclosulfamuron



1-[2-(cyclopropylcarbonyl)phenylsulfamoyl]-3-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)urea

C₁₇H₁₉N₅O₆S MW: 421.4 CAS No.: 136849-15-5

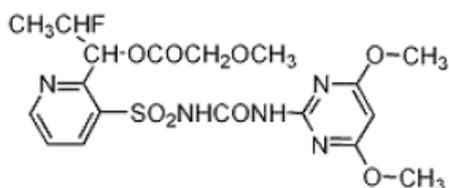
Ethoxysulfuron



1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-(2-ethoxyphenoxy)sulfonyl]urea

C₁₅H₁₈N₄O₇S MW: 398.4 CAS No.: 126801-58-9

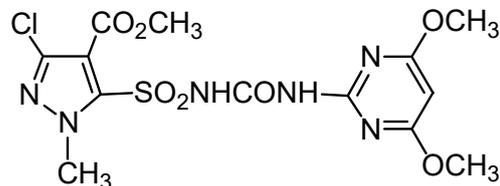
Flucetosulfuron



1-{3- [(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoyl)sulfamoyl]-2-pyridyl}-2-fluoropropyl methoxyacetate

C₁₈H₂₂FN₅O₈S MW: 487.5 CAS No.: 412928-75-7

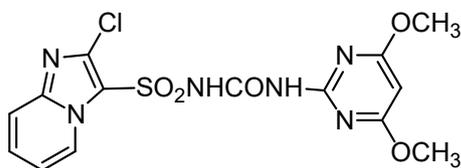
Halosulfuron-methyl



methyl 3-chloro-5-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoylsulfamoyl)-1-methylpyrazole-4-carboxylate

C₁₃H₁₅ClN₆O₇S MW: 434.8 CAS No.: 100784-20-1

Imazosulfuron



1-(2-chloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-ylsulfonyl)-3-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)urea

C₁₄H₁₃ClN₆O₅S MW: 412.8 CAS No.: 122548-33-8

Fig. 1 Chemical structures of azimsulfuron, bensulfuron-methyl, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び籾米はそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し、分析用試料とした。WCRS は 60 °C で 10 時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉碎し、分析用試料とした。

2.2 試薬

1) アセトニトリル、アセトン、酢酸エチル及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは液体クロマトグラフ用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。塩酸及びギ酸（質量分率 98 %）は試薬特級を用いた。酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用（1 mol/L 水溶液、富士フィルム和光純薬製）を用いた。水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) 各農薬標準品

アジムスルフロン、 Bensulfuron-methyl, シクロスルファムロン, エトキシスルフロン, フルセトスルフロン, ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンの標準品は、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）。

4) 農薬混合標準液

7 成分の農薬標準原液各 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、各農薬としてそれぞれ 20 µg を含有）。

使用に際して、農薬混合標準原液の一定量を、アセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬として 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng を含有する各農薬混合標準液を調製した。

5) 1 v/v%ギ酸溶液

ギ酸 1 mL に水を加えて 100 mL とした。

Table 1 Pesticide standards used in the present study

Compound	Manufacturer	Molecular formula	MW	CAS No.	Purity(%)
Azimsulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C ₁₃ H ₁₆ N ₁₀ O ₅ S	424.40	120162-55-2	99.9
Bensulfuron-methyl	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C ₁₆ H ₁₈ N ₄ O ₇ S	410.40	83055-99-6	100
Cyclosulfamuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C ₁₇ H ₁₉ N ₅ O ₆ S	421.43	136849-15-5	99.3
Ethoxysulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₇ S	398.39	126801-58-9	99.7
Flucetosulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C ₁₈ H ₂₂ FN ₅ O ₈ S	487.46	412928-75-7	99.6
Halosulfuron-methyl	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C ₁₃ H ₁₅ ClN ₆ O ₇ S	434.81	100784-20-1	99.9
Imazosulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₆ O ₅ S	412.81	122548-33-8	100

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機 :

粉砕機 1 (粳米用) : ZM 200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 18000 rpm)

粉砕機 2 (稲わら及び WCRS 用) : SM 100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

2) 振り混ぜ機 : レシプロシェーカー SR-2W タイテック製 (使用時振とう数 300 rpm)

3) 多孔性ケイソウ土カラム : InertSep K-solute (5 mL 保持用) ジーエルサイエンス製

4) グラファイトカーボンミニカラム (以下「ミニカラム」という.) : ENVI-Carb (500 mg) Sigma-Aldrich 製

5) メンブランフィルター : DISMIC-25HP (孔径 0.20 μm , 直径 25 mm, 親水性 PTFE) 東洋濾紙製

6) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS/MS 部 : ACQUITY TQ Detector 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 を加え, 30 分間静置後, 更にアセトン 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. さらに, 全量フラスコの標線までアセトンを加えた. この液 10 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し, カラム処理 I に供する試料溶液とした.

2) カラム処理 I

試料溶液に 0.1 mol/L 塩酸 2.5 mL を加え軽く振り混ぜた後, 多孔性ケイソウ土カラム (5 mL 保持用) に入れ, 10 分間静置した.

100 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き, 試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-酢酸エチル (3+1) 5 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た後, 更にヘキサン-酢酸エチル (3+1) 40 mL をカラムに加え, ベンスルフロロンメチル等を溶出させた.

溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. アセトニトリル-水-ギ酸 (50+50+1) 10 mL を加えて残留物を溶かし, カラム処理 II に供する試料溶液とした.

3) カラム処理 II

ミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び 1 v/v%ギ酸溶液 5 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下 (必要に応じて流速が 1 mL/min 程度になるよう吸引した. 以下同様.) した. 試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル-ギ酸 (99+1) 5 mL ずつで 2 回洗浄し, 洗液をミニカラムに加え, 同様に流出させた.

100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, アセトニトリル-トルエン-ギ酸

(75+25+1) 30 mL をミニカラムに加えてベンシルスロンメチル等を溶出させた。

溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後，窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル-水 (1+1) 5 mL を正確に加えて残留物を溶かした後，メンブランフィルターでろ過し，LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

4) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各農薬混合標準液各 4 μ 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 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	Mightsyl RP-18 GP (2.0 mm i.d. \times 150 mm, 5 μ m), Kanto Chemical
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate solution- methanol (9:1) \rightarrow 5 min \rightarrow (1:1) (hold for 15 min) \rightarrow (1:9) (hold for 15 min) \rightarrow 5 min \rightarrow (9:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI) (Positive ion mode)
Source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ (600 L/h, 400 °C)
Capillary voltage	1.0 kV
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

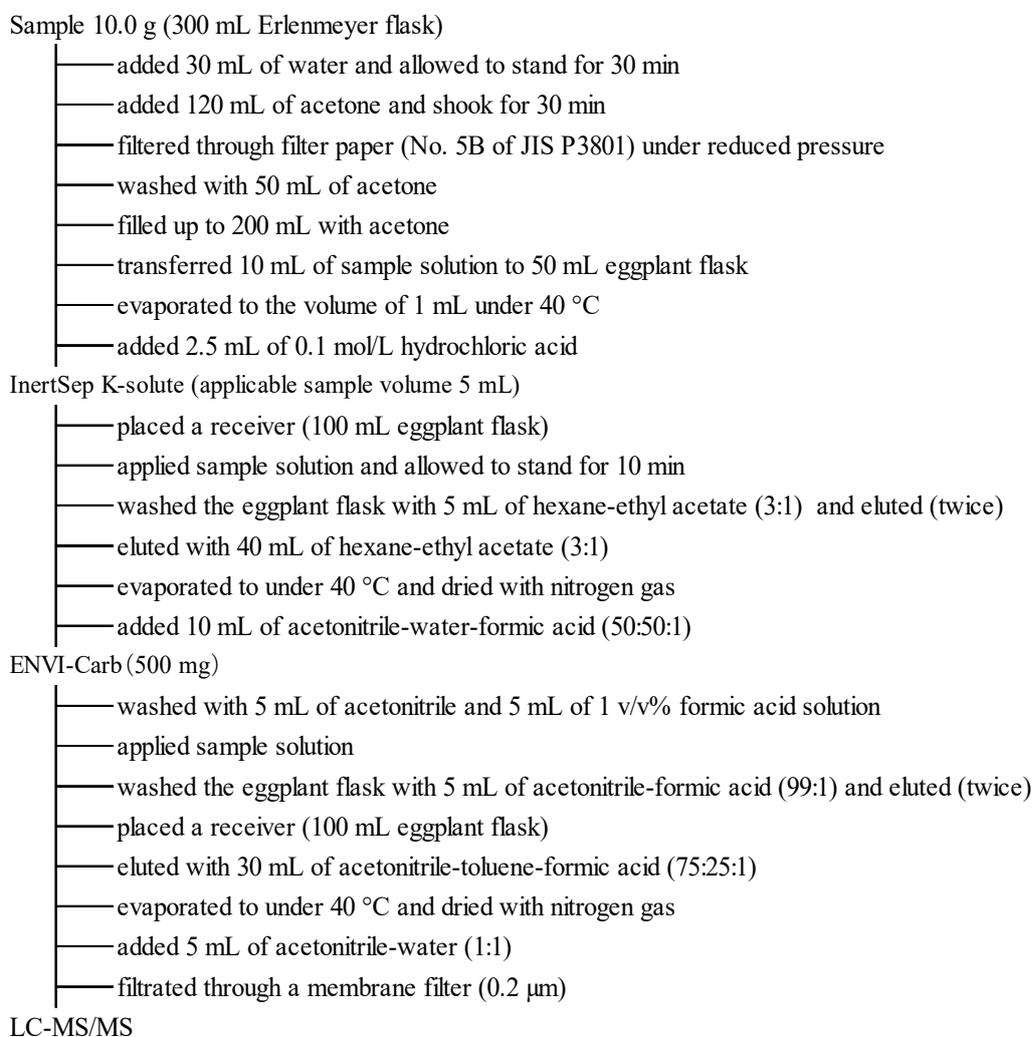
Table 3 MS/MS parameters

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>)		
Azimsulfuron	425	182	—	25	15
		—	156	25	36
Bensulfuron-methyl	411	149	—	28	21
		—	91	28	58
Cyclosulfamuron	422	261	—	25	16
		—	218	25	27
Ethoxysulfuron	399	261	—	27	14
		—	218	27	24
Flucetosulfuron	488	156	—	32	17
		—	273	32	23
Halosulfuron-methyl	435	182	—	27	20
		—	83	27	52
Imazosulfuron	413	153	—	22	10
		—	258	22	23

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 azimsulfuron, bensulfuron-methyl, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron in rice straw, whole-crop silage (WCRS) and paddy rice

2.5 添加回収試験

2.2 の 3) の各農薬標準原液をアセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し添加に用いた。

アジムスルフロン, ベンスルフロンメチル, シクロスルファムロン, エトキシスルフロン, フルセトスルフロン, ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンとしてそれぞれ, 稲わらに 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 1 及び 20 ng/mL), WCRS に原物換算して 0.004 及び 0.09 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 1 及び 20 ng/mL), 粳米に 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 1 及び 20 ng/mL) になるようにそれぞれ添加後よく混合し, 一夜静置した後に 2.4 に従って定量し, 平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、WCRS への添加は風乾物試料に対し各農薬として 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 %及び 10 %と想定して、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 の式により行った。

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 4)により調製した農薬混合標準液各 4 μ 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. 2-1~2-7 のとおりであり、各 0.5~100 ng/mL（注入量として 0.002~0.4 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、各農薬を 0.005~1 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する。

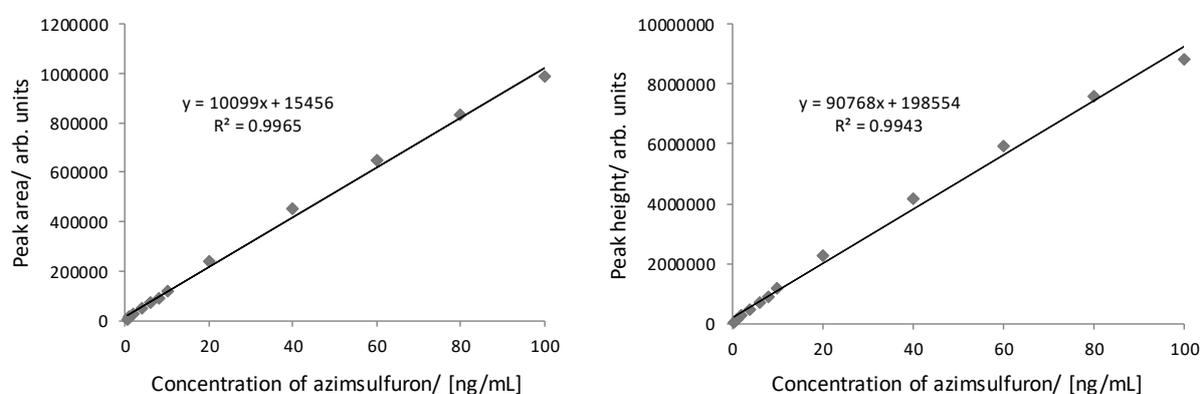


Fig. 2-1 Calibration curves of azimsulfuron by peak area (left) and peak height (right)

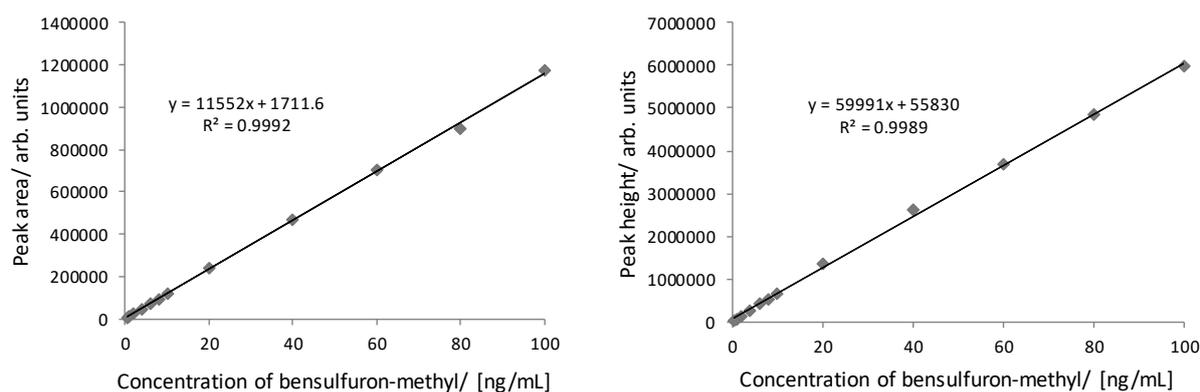


Fig. 2-2 Calibration curves of bensulfuron-methyl by peak area (left) and peak height (right)

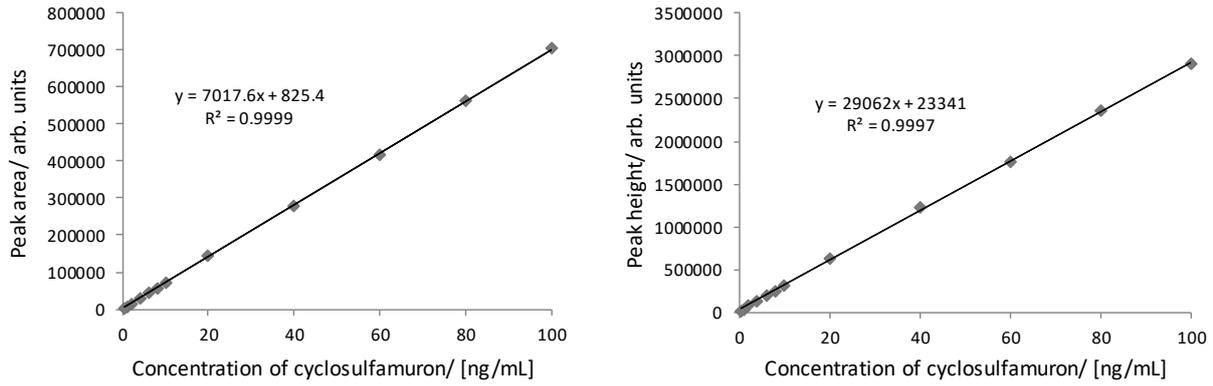


Fig. 2-3 Calibration curves of cyclosulfamuron by peak area (left) and peak height (right)

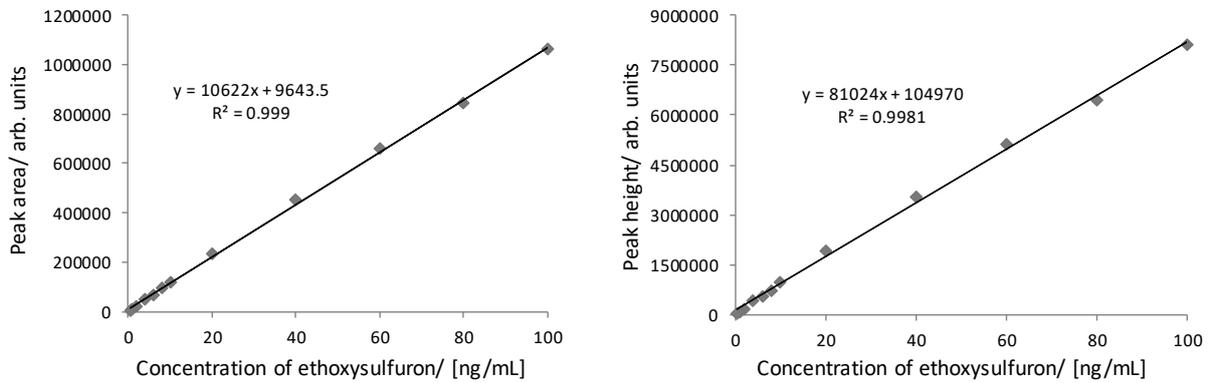


Fig. 2-4 Calibration curves of ethoxysulfuron by peak area (left) and peak height (right)

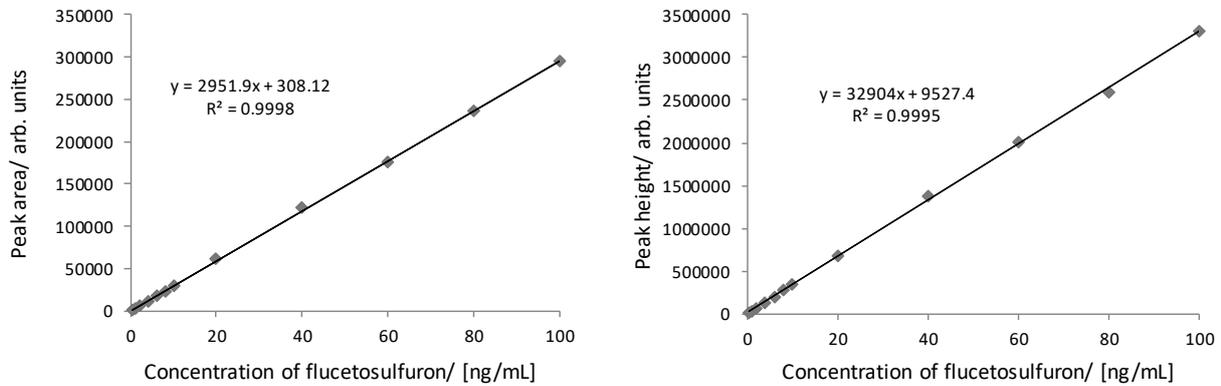


Fig. 2-5 Calibration curves of flucetosulfuron by peak area (left) and peak height (right)

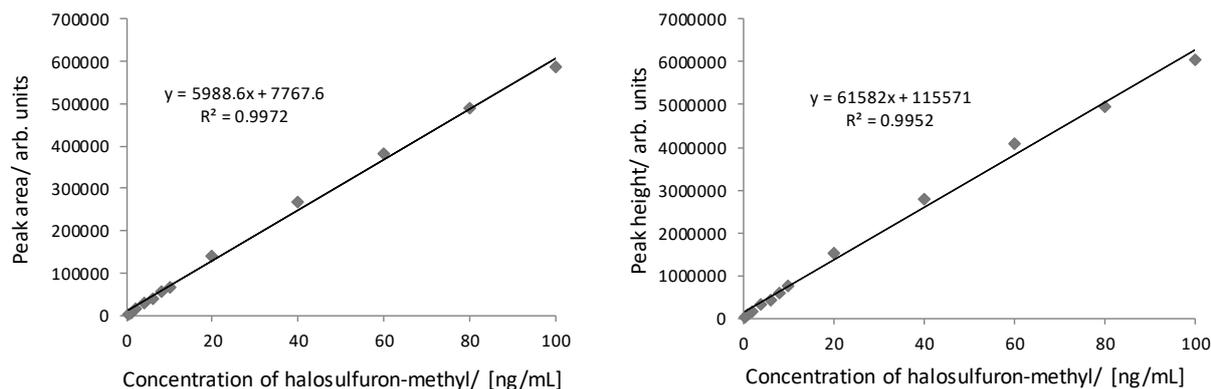


Fig. 2-6 Calibration curves of halosulfuron-methyl by peak area (left) and peak height (right)

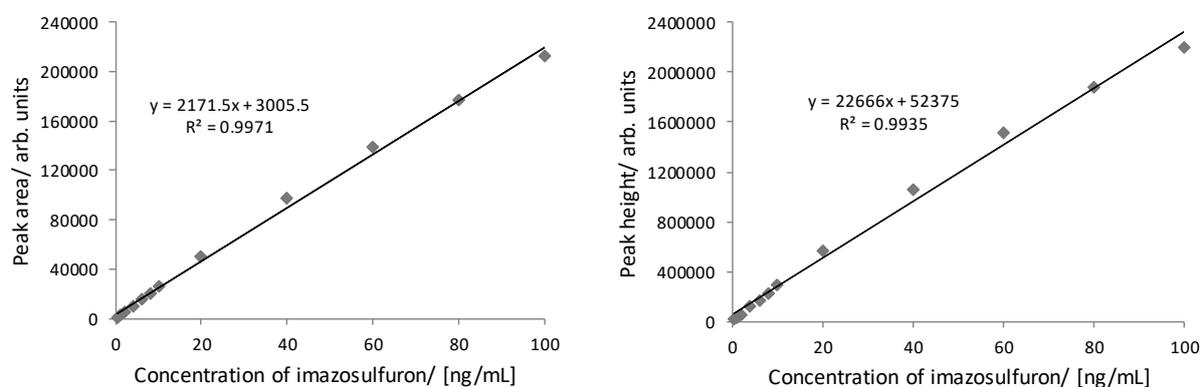


Fig. 2-7 Calibration curves of imazosulfuron by peak area (left) and peak height (right)

3.2 妨害物質の検討

稲わら 2 検体, WCRS 2 検体及び粳米 2 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。

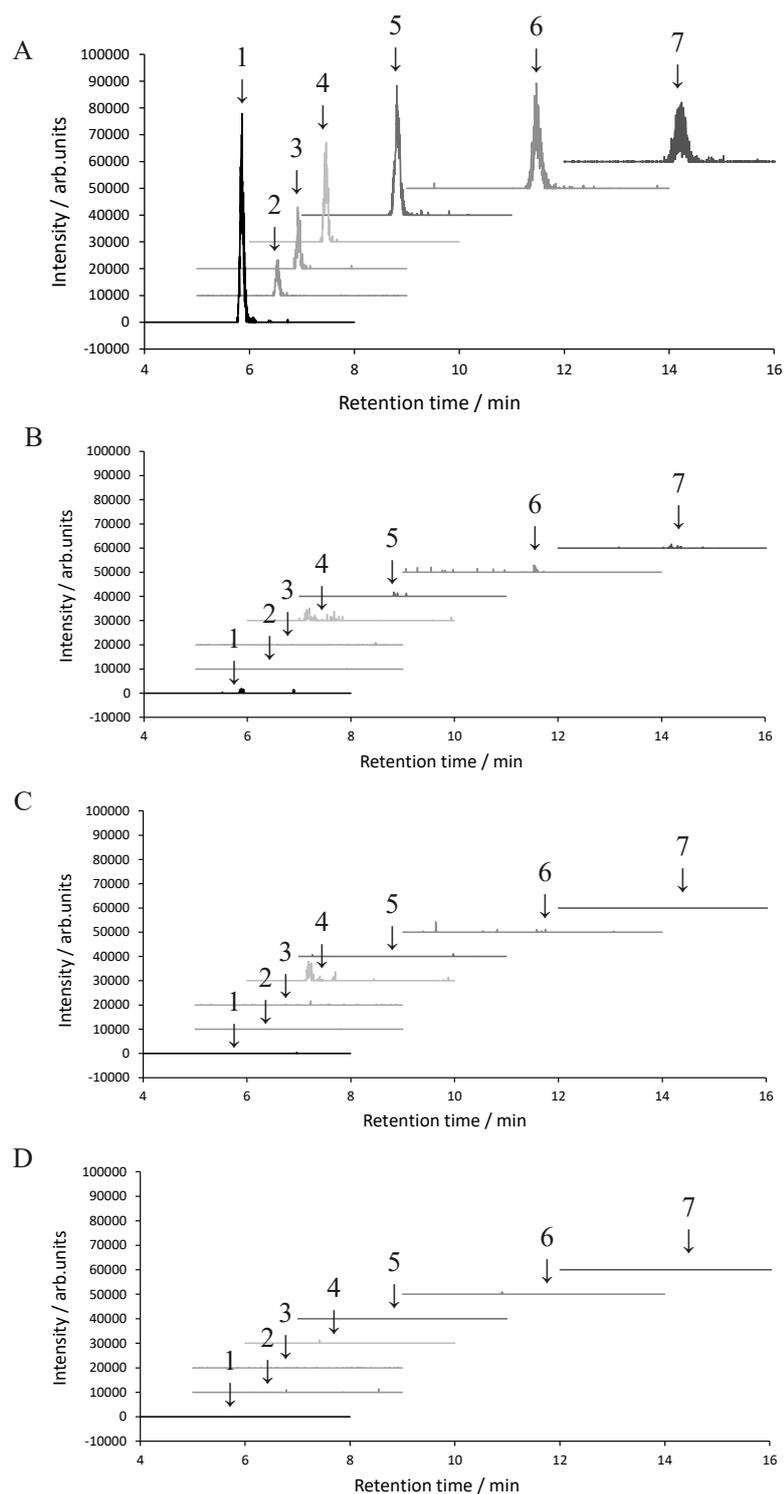


Fig. 3 Typical selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of pesticides in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention times of 1: azimsulfuron, 2: imazosulfuron, 3: flucetosulfuron, 4: halosulfuron-methyl, 5: ethoxysulfuron, 6: bensulfuron-methyl and 7: cyclosulfamuron. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (1 ng/mL: 0.004 ng as each pesticide), B: Sample solution of rice straw, C: Sample solution of WCRS, D: Sample solution of paddy rice

3.3 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, WCRS 及び籾米のブランク試料溶液にアジムスルフロン, ベンスルフロンメチル, シクロスルフアムロン, エトキシスルフロン, フルセトスルフロン, ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンとしてそれぞれ 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量) を添加した各マトリックス標準液について, 2.2 の 4) 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. その結果は Table 4 のとおりであり, 稲わら及び WCRS 中のアジムスルフロン, ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンについてはイオン化を抑制するマトリックス効果が認められたが, その他ではマトリックス効果は認められなかった.

Table 4 Matrix effect study

Pesticides	Matrix effect ^{a)} (%)		
	Rice straw	WCRS	Paddy rice
Azimsulfuron	62.4	68.9	89.1
Bensulfuron-methyl	109	107	102
Cyclosulfamuron	105	105	96.1
Ethoxysulfuron	91.7	93.3	94.1
Flucetosulfuron	82.7	87.7	96.8
Halosulfuron-methyl	51.3	49.7	85.2
Imazosulfuron	49.1	58.2	87.4

$n = 3$

a) Ratio of peak area of pesticides in the presence of matrix to that in the absence of matrix. The concentration in matrix standard solution was 10 ng/mL (spiked at 0.1 mg/kg as air-dry basis).

3.4 添加回収試験

2.5 により添加回収試験を実施した. その結果は Table 5 とおり, ベンスルフロンメチルについては, 平均回収率は 88.4~102 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 5.3 % 以下の成績が得られ, 飼料分析基準別表 3 の妥当性確認法ガイドライン⁴⁾ (以下「妥当性確認法ガイドライン」という.) に定められた目標値 (真度: 70 % 以上 120 % 以下, 精度: 22 % 以下 (添加濃度 0.01 mg/kg) 又は 20 % 以下 (同 0.2 mg/kg)) を満たす良好な結果であった.

同様に, アジムスルフロンについては, 平均回収率は 65.1~84.7 %, RSD_r は 14 % 以下, シクロスルフアムロンについては, 平均回収率は 88.8~105 %, RSD_r は 7.1 % 以下, エトキシスルフロンについては, 平均回収率は 84.9~91.2 %, RSD_r は 8.8 % 以下, フルセトスルフロンについては, 平均回収率は 78.4~87.4 %, RSD_r は 18 % 以下, ハロスルフロンメチルについては, 平均回収率は 60.9~87.9 %, RSD_r は 15 % 以下, イマゾスルフロンについては, 平均回収率は 62.5~74.5 %, RSD_r は 14 % 以下であり, シクロスルフアムロン, エトキシスルフロン及びフルセトスルフロンは妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たす良好な結果であった. しかし, アジムスルフロン, ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンについては, 稲わら及び WCRS では真度の目標値を満たしていなかった.

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 5 Recoveries for pesticides

Feed types	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Azimsulfuron		Bensulfuron-methyl		Cyclosulfamuron		Ethoxysulfuron	
		Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)						
Rice straw	0.01	75.2	9.8	96.2	2.6	99.2	1.4	88.7	4.1
	0.2	66.4	14	97.9	2.0	100	3.0	88.9	2.9
WCRS	0.004	65.1	14	88.4	2.2	95.4	3.8	84.9	4.0
	0.09	73.0	10	102	2.4	105	1.2	89.2	5.5
Paddy rice	0.01	77.4	2.0	91.9	5.3	88.8	7.1	85.3	8.8
	0.2	84.7	4.0	95.9	1.4	99.5	1.4	91.2	3.9

Feed types	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Flucetosulfuron		Halosulfuron-methyl		Imazosulfuron	
		Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
Rice straw	0.01	82.5	9.7	66.0	15	64.1	12
	0.2	80.8	6.8	60.9	11	62.5	7.0
WCRS	0.004	78.4	12	61.1	11	63.1	14
	0.09	82.4	15	65.5	15	67.6	9.6
Paddy rice	0.01	87.4	18	77.2	4.2	71.8	7.2
	0.2	85.1	6.9	87.9	11	74.5	9.0

a) The pesticides were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.01 and 0.2 mg/kg as air-dry basis for each pesticide. The levels of pesticides as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

The levels of pesticides as fed basis (moisture 60 %)

= the levels of pesticides as air-dry basis (moisture 10 %) / 2.25

b) Mean ($n = 5$)

c) Relative standard deviation of repeatability

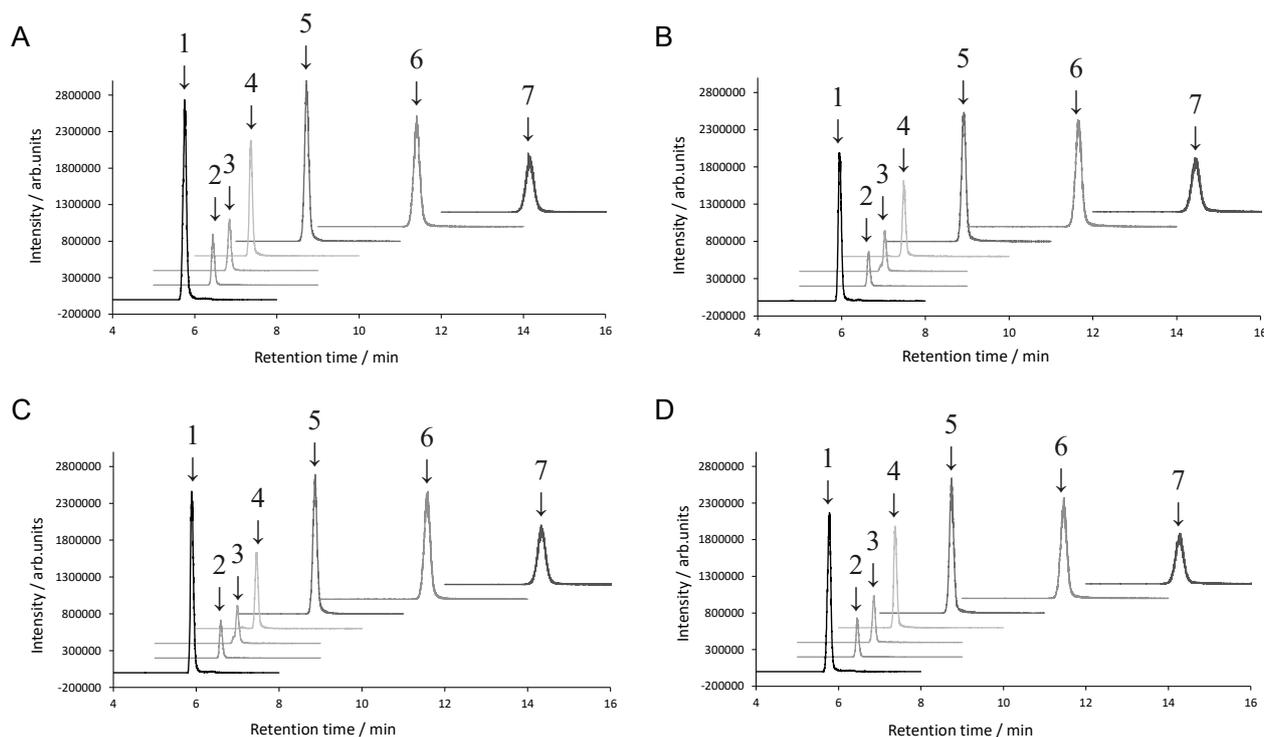


Fig. 4 Typical SRM chromatograms of pesticides in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of 1: azimsulfuron, 2: imazosulfuron, 3: flucetosulfuron, 4: halosulfuron-methyl, 5: ethoxysulfuron, 6: bensulfuron-methyl and 7: cyclosulfamuron. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (20 ng/mL: 0.08 ng as each pesticide)

B: Sample solution of rice straw (spiked at 0.2 mg/kg of each pesticide (as 20 ng/mL in sample solution))

C: Sample solution of WCRS (spiked at 0.09 mg/kg fed basis of each pesticide (as 20 ng/mL in sample solution))

D: Sample solution of paddy rice (spiked at 0.2 mg/kg of each pesticide (as 20 ng/mL in sample solution))

3.5 定量下限及び検出下限

ベンスルフロンメチルの検量線が直線性を示した範囲、各 0.5~100 ng/mL の下端付近となる濃度（試料中で 0.01 mg/kg 相当量（最終試料液中濃度 1 ng/mL 相当量））の添加回収試験の結果は Table 5 のとおり良好であり、得られたピークの SN 比が 10 以上であったため、ベンスルフロンメチルの定量下限の濃度は試料中で 0.01 mg/kg とした。この濃度は、ベンスルフロンメチルの稲わら及び WCRS 中の管理基準値の風乾物中換算値（それぞれ 0.1 及び 0.1125 mg/kg）に対してそれぞれ 1/10 及び 4/45 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（基準値に対して 1/5 以下）を満たしていた。また、ベンスルフロンメチルの検出下限を確認するため、添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた。その結果、検出下限は試料中で 0.003 mg/kg であり、同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（基準値に対して 1/10 以下）を満たしていた。

同様に、添加回収試験の結果が良好であったシクロスルファミロン、エトキシスルフロロン及びフルセトスルフロロンについても、得られたピークの SN 比が 10 以上であったため、定量下限の濃度は試料中で 0.01 mg/kg とした。また、添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる

濃度を求めたところ、検出下限は試料中で 0.003 mg/kg であった。

3.6 希釈液におけるマトリックス効果の確認

3.3 において、稲わら及び WCRS 中のアジムスルフロン、ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンについて、測定時にイオン化を抑制するマトリックス効果が認められた。そこで、最終試料溶液を希釈することによりマトリックス効果の低減を検討した。2.4 の 1)から 3)により調製した稲わら及び WCRS のブランク試料溶液に、各農薬として 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量）を添加した各マトリックス標準液並びに同マトリックス標準液をアセトニトリル-水（1+1）で 2, 5, 7 及び 10 倍に希釈した液について、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。その結果は Table 6 のとおり、アジムスルフロン、ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンについて、希釈することでマトリックス効果によるイオン化抑制の低減が認められ、5 倍以上の希釈をすることで、農薬混合標準液に対するピーク面積比が 80~120 %以内となり、マトリックスによる大きな影響を受けることなく定量が可能であった。

Table 6 Matrix effect study by diluted sample solution

Pesticides	Matrix effect ^{a)} (%)									
	Rice straw					WCRS				
	×1 ^{b)}	×2 ^{c)}	×5 ^{d)}	×7 ^{e)}	×10 ^{f)}	×1 ^{b)}	×2 ^{c)}	×5 ^{d)}	×7 ^{e)}	×10 ^{f)}
Azimsulfuron	74.8	87.8	94.4	102	99.1	66.6	64.1	95.4	101	101
Bensulfuron-methyl	96.9	100	96.7	93.2	91.0	96.7	92.2	100	103	91.8
Cyclosulfamuron	96.4	101	96.8	102	92.3	96.1	98.0	97.5	104	94.7
Ethoxysulfuron	87.7	99.3	92.7	103	82.3	89.8	84.9	94.3	102	86.6
Flucetosulfuron	79.5	90.5	100	107	88.0	78.1	74.0	98.0	104	86.0
Halosulfuron-methyl	70.2	82.6	92.4	102	105	63.8	59.6	82.9	104	111
Imazosulfuron	67.7	83.1	91.9	98.1	86.6	65.5	67.0	89.7	104	81.0

a) Ratio of peak area of pesticides in the presence of matrix to that in the absence of matrix. The concentration in matrix standard solution was 10 ng/mL (spiked at 0.1 mg/kg as air-dry basis).

b) $n = 3$ (no dilution)

c) $n = 1$ (2 times dilution)

d) $n = 3$ (5 times dilution)

e) $n = 2$ (7 times dilution)

f) $n = 1$ (10 times dilution)

4 まとめ

飼料用稲に残留するベンスルフロンメチルについて、LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。また、アジムスルフロン、イマゾスルフロン、エトキシスルフロン、シクロスルファムロン、ハロスルフロンメチル及びフルセトスルフロンについて、ベンスルフロンメチルとの同時定量法としての適用を併行して検討したところ、以下の結果が得られた。

1) 検量線はそれぞれ 0.5~100 ng/mL 相当量（注入量として 0.002~0.4 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、各農薬を 0.005~1 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の濃度範囲に相当する。

- 2) 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) 本法に従い得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、ベンシルスロンメチルについてはマトリックス効果は認められなかったが、稲わら及び WCRS 中のアジムスルフロロン、イマズスルフロロン及びハロスルフロロンメチルはマトリックスによる影響が認められた。
- 4) 稲わら及び粳米に各農薬として 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量、WCRS に各農薬として原物換算して 0.004 及び 0.09 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 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、ベンシルスロンメチルについては妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。また、エトキシスルフロロン、シクロスルファミロン及びフルセトスルフロロンについても妥当性確認法ガイドラインの目標値を満たしていた。
- 5) 本法のベンシルスロンメチルの定量下限は 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。同様に、エトキシスルフロロン、シクロスルファミロン及びフルセトスルフロロンの定量下限は 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg であった。
- 6) 本法においてマトリックスによる影響が認められた稲わら及び WCRS 中のアジムスルフロロン、イマズスルフロロン及びハロスルフロロンメチルについて、最終試料溶液を溶媒で希釈して測定したところ、5 倍以上に希釈することで、マトリックス効果による影響を受けずに測定が可能であった。

文 献

- 1) 食品安全委員会農薬専門調査会：農薬評価書 ベンシルスロンメチル，平成 22 年 10 月 (2010).
- 2) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 4) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 25 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2014).
- 5) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 27 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2016).
- 6) 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 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2010).

5 稲わら中のベンフラカルブ及びカルボスルファンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の開発

顯谷 久典^{*1}, 近藤 勝^{*2}, 船水 悦子^{*2}, 荒木 愛^{*3}, 青山 幸二^{*4}

Development of Simultaneous Determination Method of Benfuracarb and Carbosulfan in Rice Straw by LC-MS/MS

ARAYA Hisanori^{*1}, KONDO Masaru^{*2}, FUNAMIZU Etusko^{*2}, ARAKI Ai^{*3} and AOYAMA Koji^{*4}

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

^{*2} Sapporo Regional Center, FAMIC,

^{*3} Sapporo Regional Center, FAMIC (Now Food Labeling Monitoring Department),

^{*4} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have developed a simultaneous quantitative determination method of the concentration of benfuracarb and carbosulfan in rice straw using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Having added silver nitrate solution and phosphate buffer (pH 8.0) to a sample, benfuracarb and carbosulfan were extracted with acetone, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then diluted with acetone. The diluted solution was purified with a solid phase extraction (SPE) column I (Bond Elut Jr C18, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA), and injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of benfuracarb and carbosulfan. LC separation was then carried out on a ODS column (Mightysil RP-18GP, 2.0 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Kanto Chemical Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

An elution pattern study of benfuracarb and carbosulfan from the SPE column I was conducted. A sample solution prepared by adding pesticides to acetone was applied to the SPE column I and eluted with acetonitrile, acetone, and hexane. As a result, benfuracarb was not sufficiently eluted.

Elution pattern and matrix effect studies of the pesticides were then conducted using the SPE column II (InertSep PLS-2, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) instead of the SPE column I. A sample solution prepared by adding the pesticides to a rice straw extract was applied to the SPE column II and eluted with hexane. As a result, it was confirmed that the pesticides were sufficiently eluted with hexane and the eluate with hexane effectively determined the pesticides without being affected by matrix.

In addition, an elution pattern study of the pesticides from the SPE column III (ENVI-Carb/LC-NH₂, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA) was conducted for adding a procedure of purification. A sample solution prepared by adding the pesticides to hexane was applied to the SPE column III, and eluted with different kinds of organic solvents. As a result, it was confirmed that the pesticides

*1 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, 現 肥飼料安全検査部

*2 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

*3 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター, 現 表示監視部

*4 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

were sufficiently eluted with hexane-ethyl acetate (7:3).

Key words: benfuracarb; carbosulfan; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice straw

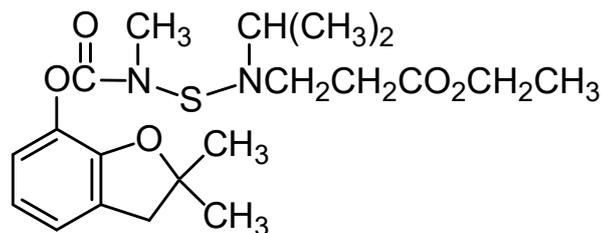
キーワード: ベンフラカルブ ; カルボスルファン ; 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 ; エレクトロスプレーイオン化法 ; 稲わら

1 緒 言

ベンフラカルブは大塚化学, カルボスルファンは FMC (米国) により開発されたカーバメート系殺虫剤であり, 昆虫の神経伝達系に存在するアセチルコリンエステラーゼの活性を阻害することにより殺虫活性を示すと考えられている¹⁾. 我が国では, ベンフラカルブは 1986 年に, カルボスルファンは 1983 年に初回農薬登録されている. カルボスルファンについては, 飼料中の管理基準値²⁾として, 稲わらで 0.7 mg/kg, 稲発酵粗飼料 (以下「WCRS」という.) で 1 mg/kg が設定されているが, 分析法が飼料分析基準³⁾に記載されていない. また, ベンフラカルブについては飼料中の基準値は設定されていないものの, ベンフラカルブ及びカルボスルファンの共通代謝・分解物であるカルボフラン又は 3-OH カルボフランが検出された場合, その親化合物を確認するため, ベンフラカルブとカルボスルファンは同時に分析できることが望ましいと考えられる.

そこで, 財団法人日本食品分析センターが平成 21 年度及び平成 23 年度に「飼料中の有害物質等分析法開発委託事業」において開発した分析法^{4), 5)} (以下「JFRL 法」という.) を基に, 飼料用稲 (稲わら, WCRS) を対象とするベンフラカルブ及びカルボスルファン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.) による同時定量法の飼料分析基準への収載の可否を検討したので, その概要を報告する.

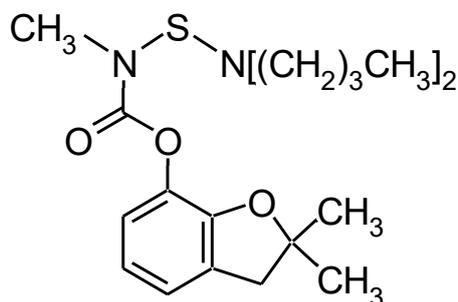
参考にベンフラカルブ及びカルボスルファンの構造式等を Fig. 1 に示した.



Benfuracarb

ethyl N-[2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-
yloxycarbonyl(methyl)-aminothio]-N-isopropyl-β-alaninate

C₂₀H₃₀N₂O₅S MW: 410.5 CAS No.: 82560-54-1



Carbosulfan

2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-
yl(dibutylaminothio)methylcarbamate

C₂₀H₃₂N₂O₃S MW: 380.5 CAS No.: 55285-14-8

Fig. 1 Chemical structures of benfuracarb and carbosulfan

2 実験方法

2.1 試料

稲わらは目開き 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) アセトン, 酢酸エチル及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。アセトニトリルは残留農薬・PCB 試験用 (LC-MS/MS の溶離液のみ LC-MS 用 (関東化学製)) を用いた。1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用 (関東化学製) を用いた。硝酸銀, リン酸水素二ナトリウム及びリン酸二水素カリウムは試薬特級を用いた。水は Milli-Q Advantage (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。
- 2) 1/15 mol/L リン酸緩衝液 (pH 8.0)
1/15 mol/L リン酸水素二ナトリウム溶液に 1/15 mol/L リン酸二水素カリウム溶液を加えて pH 8.0 に調整した。
- 3) ベンフラカルブ標準原液
ベンフラカルブ標準品 (富士フィルム和光純薬製, 純度 99.6 %) 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ベンフラ

カルブ標準原液を調製した（この液 1 mL は、ベンフラカルブとして 0.5 mg を含有）。

4) カルボスルファン標準原液

カルボスルファン標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 99.8 %）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カルボスルファン標準原液を調製した（この液 1 mL は，カルボスルファンとして 0.5 mg を含有）。

5) 混合標準液

各標準原液 1 mL を 50 mL の全量フラスコに入れて混合し，更に標線までアセトンを加えて混合標準原液を調製した（この液 1 mL は，ベンフラカルブ及びカルボスルファンとして各 10 µg を含有）。

使用に際して，混合標準原液の一定量を，アセトニトリルで正確に希釈し，1 mL 中にベンフラカルブ及びカルボスルファンとして 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4 及び 5 ng を含有する各混合標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：SM 100 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，回転数（仕様）1430 rpm）
- 2) 振り混ぜ機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振とう数 300 rpm）
- 3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（以下「ミニカラム I」という。）：Bond Elut Jr C18（500 mg）Agilent Technologies 製
- 4) スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（以下「ミニカラム II」という。）：InertSep PLS-2（270 mg）ジーエルサイエンス製
- 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（以下「ミニカラム III」という。）：ENVI-Carb/LC-NH2（500 mg/500 mg）Sigma-Aldrich 製
- 6) メンブランフィルター：DISMIC-13HP（孔径 0.45 µm，直径 13 mm，親水性 PTFE）東洋濾紙製
- 7) LC-MS/MS：
LC 部：ACQUITY UPLC System Waters 製
MS 部：Quattro Premier XE Waters 製

2.4 定量方法（JFRL 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，0.1 mol/L 硝酸銀溶液 2 mL 及び 1/15 mol/L リン酸緩衝液 30 mL を加え，30 分間静置後，更にアセトン 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 40 mL で洗浄し，同様に吸引ろ過した。さらに全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液を，カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

ミニカラム I をアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄した。試料溶液 2 mL をあらかじめ水 20 mL を入れた容器に正確に加え混和し，ミニカラム I に入れ，液面が充てん剤の上端に達するまで流出（流速が 1~2 mL/min 程度になるよう吸引した。以下同様。）させた。試料溶液の入っていた容器をアセトニトリル-水（2+3）10 mL で洗浄し，洗液をミニカラム I に加え，

全量を流出させた。10 mL の全量フラスコをミニカラム I の下に置き、アセトニトリル 10 mL をミニカラム I に加えてベンフラカルブ及びカルボスルファンを溶出させた後にメンブランフィルターでろ過し、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各混合標準液各 2 μ 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 1 及び 2 に示した。

Table 1 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	Mightysil RP-18GP (2 mm i.d. \times 150 mm, 5 μ m), Kanto Chemical
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate – acetonitrile (1:1) \rightarrow 3 min \rightarrow (1:19) (hold for 15 min)
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 ₂ (800 L/h, 400 $^{\circ}$ C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	2.5 kV
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

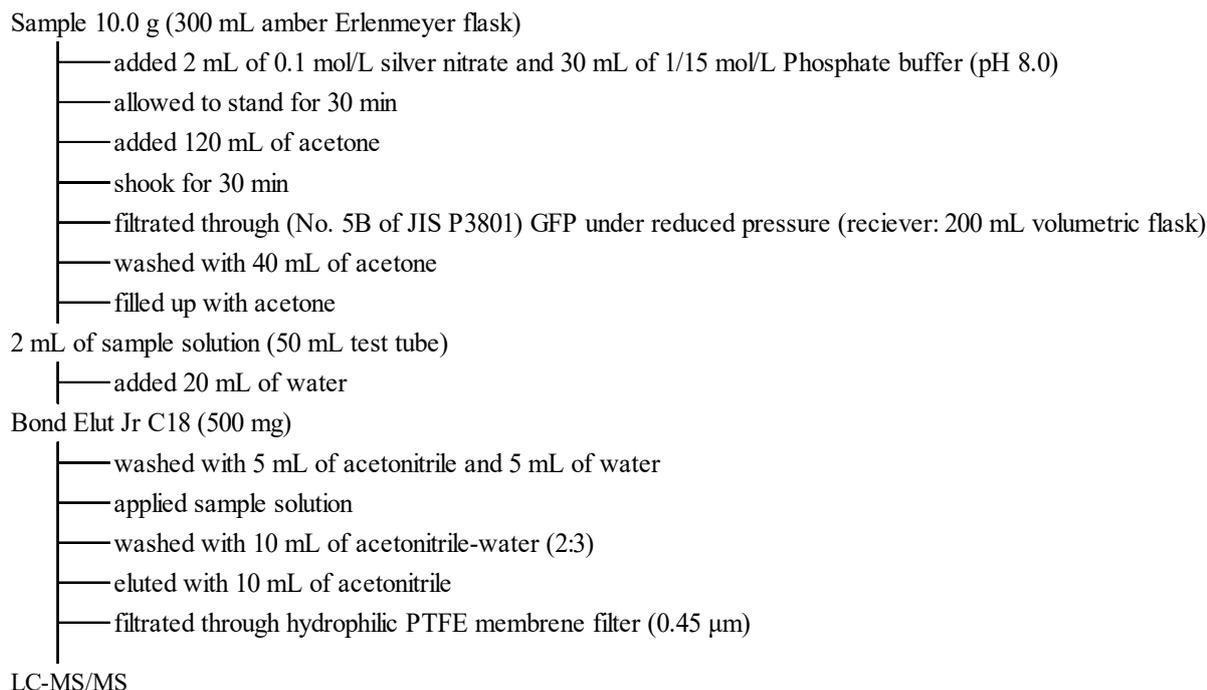
Table 2 MS/MS parameters

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>)		
Benfuracarb	411	195	-	46	31
		-	190	46	17
Carbosulfan	381	118	-	21	27
		-	160	21	21

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、試料中のベンフラカルブ量及びカルボスルファン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for benfuracarb and carbosulfan (developed by JFRL)

2.5 ミニカラム I (Bond Elut Jr C18) からの溶出画分の確認

ベンフラカルブ及びカルボスルファンとしてそれぞれ 0.07 mg/kg 相当量となるよう添加したアセトン 2 mL を、あらかじめ水 20 mL を入れた容器に加え混和し、カラム処理に供する標準液を調製した。以降、異なる 2 ロットのミニカラム I について、以下のとおり溶出画分の確認を実施した。

- 1) ヘキサン 5 mL, アセトン 5 mL, アセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL の順にミニカラム I を洗浄後、標準液を加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させ、その全量を採取した。
- 2) 1)の後、標準液の入っていた容器をアセトニトリル-水 (2+3) 10 mL で洗浄し、洗液をミニカラム I に加え流出させ、その全量を採取した。
- 3) 2)の後、アセトニトリルをミニカラム I に加え、0~5 mL, 5~10 mL, 10~15 mL, 15~20 mL の溶出画分を採取した。
- 4) 3)でアセトニトリルを加えた後、更にアセトン 5 mL, ヘキサン 5 mL を順次ミニカラム I に加え、20~25 mL 及び 25~30 mL の溶出画分を採取した。

1), 2)及び 4)については、溶媒をアセトニトリルに置換後、また 3)についてはそのまま 2.4 の 3)及び 4)に従って定量した。

2.6 ミニカラム II (InertSep PLS-2) からの溶出画分の確認

ベンフラカルブ及びカルボスルファンとしてそれぞれ 0.07 mg/kg 相当量となるよう添加したアセトン 2 mL を、あらかじめ水 20 mL を入れた容器に加え混和し、カラム処理に供する標準液を調製した。ミニカラム II をヘキサン 5 mL, アセトン 5 mL, アセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL の順に洗浄後、標準液をミニカラム II に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。その後、標準液の入っていた容器をアセトニトリル-水 (2+3) で洗浄し、洗液をミニカラム II に加え、液面が充填剤の上端に達するまで流出させ 10 mL を採取し画分液とした。その後、アセト

ニトリル-水 (3+2) , アセトニトリル-水 (7+3) , アセトニトリル-水 (4+1) , アセトニトリル-水 (9+1) , アセトニトリル, アセトン及びヘキサンの順に各 10 mL を順次ミニカラム II に加え, 流出液を 10 mL ごとに採取し画分液とした. 採取した画分液の溶媒をアセトニトリルに置換後, 2.4 の 3)及び 4)に従って定量した.

2.7 ミニカラム II (InertSep PLS-2) からの溶出画分の確認 (稲わら試料溶液)

稲わらを用いて 2.4 の 1)により抽出し, これにベンフラカルブ及びカルボスルファンとしてそれぞれ 0.7 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中でそれぞれ 1.4 ng/mL 相当量) を添加した抽出液 0.2 mL を, あらかじめ 1/15 mol/L リン酸緩衝液 20 mL を入れた容器に加え混和し, カラム処理に供する試料溶液を調製した. ミニカラム II をヘキサン 5 mL, アセトニトリル 5 mL 及び 1/15 mol/L リン酸緩衝液 5 mL の順に洗浄後, 試料溶液をミニカラム II に入れ, 液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. さらにアセトニトリル-水 (2+3) 10 mL を試料溶液の入っていた容器に加えて洗浄し, 洗液をミニカラムに加えて全量を流出させた. その後, ヘキサンをミニカラム II に加え, 0~5 mL, 5~10 mL, 10~15 mL, 15~20 mL の溶出画分を採取した. 採取した画分液の溶媒をアセトニトリルに置換後, 2.4 の 3)及び 4)に従って定量した.

一方, 農薬を添加しない抽出液についても同様に処理し, 採取した画分液にベンフラカルブ及びカルボスルファンとしてそれぞれ 0.7 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中でそれぞれ 1.4 ng/mL 相当量) を加え, 溶媒をアセトニトリルに置換後, 2.4 の 3)及び 4)に従って定量し, マトリックス効果を確認した.

2.8 ミニカラム III (ENVI-Carb/LC-NH2) からの溶出画分の確認

ベンフラカルブ及びカルボスルファンとしてそれぞれ 45 ng をヘキサンに添加した標準液 10 mL を調製した. ミニカラム III を酢酸エチル 10 mL 及びヘキサン 10 mL で洗浄後, ミニカラム III に試料溶液, ヘキサン-酢酸エチル (9+1) , ヘキサン-酢酸エチル (7+3) , ヘキサン-酢酸エチル (1+1) , ヘキサン-酢酸エチル (3+7) , ヘキサン-酢酸エチル (1+9) , 酢酸エチルの順に各 10 mL を加え, 溶出画分を採取した. 採取した画分液の溶媒をアセトニトリルに置換後, 2.4 の 3)及び 4)に従って定量した.

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 5)により調製した各混合標準液各 2 μ 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. 2-1 及び Fig. 2-2 のとおりであり, 各 0.05~5 ng/mL (注入量として 0.0001~0.01 ng 相当量) の範囲で直線性を示した.

なお, 当該検量線の濃度範囲は, JFRL 法としてベンフラカルブ及びカルボスルファンを各 0.005~0.5 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する.

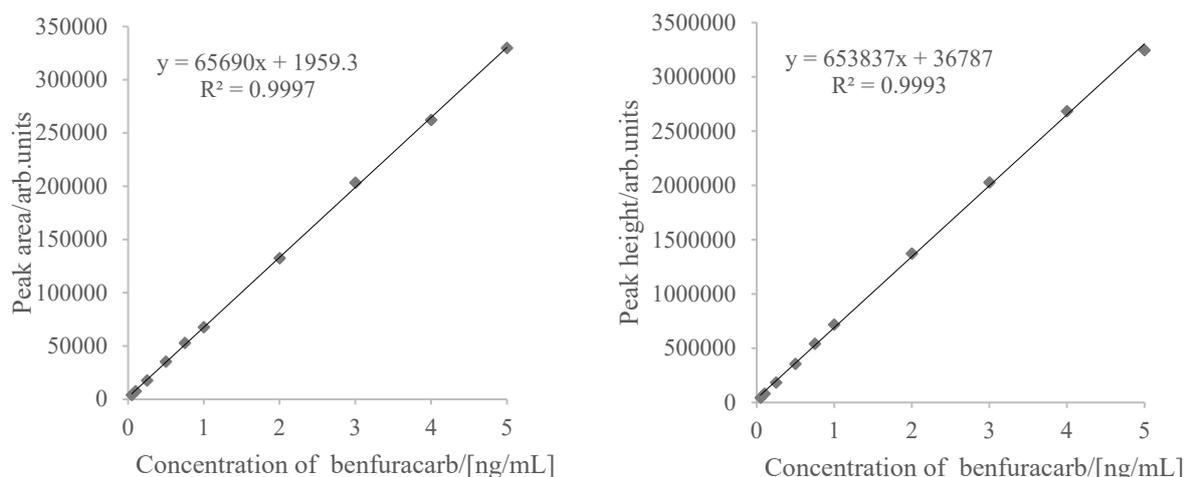


Fig. 2-1 Calibration curves of benfuracarb by peak area (left) and peak height (right)

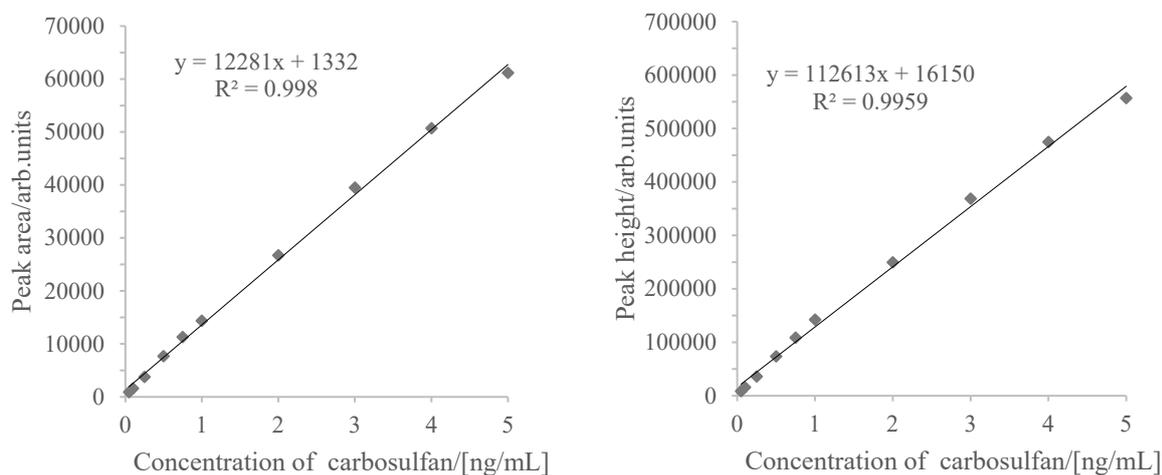


Fig. 2-2 Calibration curves of carbosulfan by peak area (left) and peak height (right)

3.2 ミニカラム I (Bond Elut Jr C18) からの溶出画分の確認

JFRL 法により稲わらを用いた添加回収試験等の予備検討を行ったところ、いずれも良好な結果が得られなかった。そこで、ミニカラム I の 2 ロットについて、2.5 に従い溶出画分を確認した。その結果は Table 3 のとおりであり、いずれの農薬も JFRL 法の溶出溶媒であるアセトニトリルでは十分に溶出されておらず、特にベンフラカルブはヘキサンでも十分に溶出されないことが判明した。

Table 3 Elution patterns of benfuracarb and carbosulfan from Bond Elut Jr C18
(standard solution)

Pesticides	Serial/Lot No.	Recovery (%)								Total	
		Acetone-water (2:20)		Acetonitrile-water (2:3)		Acetonitrile			Acetone		Hexane
		about 20 mL	10 mL	0~5 mL	5~10 mL	10~15 mL	15~20 mL	20~25 mL	25~30 mL		
Benfuracarb	6577167-02	2	0	39	1	1	3	1	3	50	
	6593655-01	0	1	45	1	4	2	2	4	59	
Carbosulfan	6577167-02	4	1	38	3	3	6	4	19	77	
	6593655-01	0	2	39	6	3	5	7	32	93	

$n = 1$

3.3 ミニカラム II (InertSep PLS-2) からの溶出画分の確認

ミニカラム I ではベンフラカルブが溶出されないことが判明したため、JFRL 法検討時にミニカラム I との精製の差が認められなかったと報告されているミニカラム II について、2.6 に従い溶出画分を確認した。その結果は Table 4 のとおりであった。ミニカラム II は低極性のカラムであり、溶出溶媒の極性が低くなるほど各農薬は溶出されやすくなる。Table 4 より、アセトニトリル水 (2+3) では各農薬が溶出されず、ヘキサンではほぼすべて溶出されたことから、各農薬を負荷後、アセトニトリル水 (2+3) で洗浄し、ヘキサンにより溶出することが適当と考えられた。

次に、2.7 に従い、稲わらの試料溶液を用い、各農薬のヘキサンの溶出画分及び各画分の試料マトリックスによる測定値への影響を確認した。なお、マトリックスの影響を少なくするため試料溶液は 0.2 mL とした。また、試料溶液を水で希釈した場合、良好な結果が得られなかったことから、試料溶液は 1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈することとした。その結果は Table 5 のとおり、各農薬はヘキサン 20 mL で溶出され、いずれの画分も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。

Table 4 Elution patterns of benfuracarb and carbosulfan from InertSep PLS-2 (standard solution)

Pesticides	Recovery (%)									Total
	Acetone-water		Acetonitrile-water				Acetonitrile	Acetone	Hexane	
	(2:20)	(2:3)	(3:2)	(7:3)	(4:1)	(9:1)				
	about 20 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	
Benfuracarb	0	0	5	77	3	1	0	0	0	87
Carbosulfan	0	0	0	4	71	6	0	3	22	105

$n = 1$

Table 5 Elution patterns and matrix effects of benfuracarb and carbosulfan from InertSep PLS-2 (matrix: rice straw)

	Pesticides	Recovery (%)				Total
		Hexane				
		0~5 mL	5~10 mL	10~15 mL	15~20 mL	
Elution pattern	Benfuracarb	87	12	4	1	103
	Carbosulfan	89	17	12	11	129
Matrix effect	Benfuracarb	88	90	89	85	-
	Carbosulfan	116	117	115	115	-

n=3

3.4 ミニカラム III (ENVI-Carb/LC-NH2) からの溶出画分の確認

ミニカラム II からヘキサンで各農薬を溶出する場合、精製が不十分であることが考えられたため、他の精製カラムの追加を検討した。厚生省医薬食品局食品安全部長通知試験法⁶⁾（以下「通知法」という。）を参考に、ミニカラム III からの溶出画分を、2.8 に従って確認した。その結果は Table 6 のとおり、各農薬のヘキサン溶液を負荷し、ヘキサン-酢酸エチル (7+3) で溶出することにより 70 %以上の農薬が回収できたことから、同様の溶媒組成であるミニカラム II からのヘキサン溶出液についてもミニカラム III で精製が可能であることが示唆された。

Table 6 Elution patterns of benfuracarb and carbosulfan from ENVI-Carb/LC-NH2 (standard solution)

Pesticides	Hexane	Recovery (%)						Total
		Hexane-ethyl acetate					Ethyl acetate	
		(9:1)	(7:3)	(1:1)	(3:7)	(1:9)		
10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL		
Benfuracarb	0	69	4	1	1	1	1	76
Carbosulfan	0	97	2	1	0	1	0	101

n=1

4 まとめ

飼料用稲に残留するベンフラカルブ及びカルボスルファンについて、LC-MS/MS を用いた同時定量法 (JFRL 法) の飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。

1) 検量線はそれぞれ JFRL 法として各 0.05~5 ng/mL 相当量 (注入量として各 0.0001~0.01 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、ベンフラカルブ及びカルボスルファンを各 0.005~0.5 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する。

2) ミニカラム I (Bond Elut Jr C18) のロット間差による影響及び溶出パターンを確認するため、試料溶液を導入せず、アセトニトリル-水、アセトニトリル、アセトン及びヘキサンで溶出画分を確認した結果、確認した 2 ロットともに、ベンフラカルブの十分な溶出が認められなかった。

- 3) JFRL 法検討時にミニカラム I との精製の差が認められなかったと報告されているミニカラム II (InertSep PLS-2) について、溶出画分を確認した。その結果、各農薬の溶出にはヘキサンが適当と考えられた。
- 4) ミニカラム II を使用し、稲わらの試料溶液 0.2 mL を用い、試料溶液は 1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈し、各農薬のヘキサンの溶出画分及び各画分のマトリックス効果を確認した。その結果ヘキサン 20 mL で各農薬が十分に溶出された。
- 5) ミニカラム II による精製後、さらに追加のミニカラムによる精製を検討するため、通知法を参考に、ミニカラム III (ENVI-Carb/LC-NH2) からの溶出画分を確認した。その結果、ミニカラム II からのヘキサン溶出液を負荷し、ヘキサン-酢酸エチル (7+3) により溶出することにより、70 %以上の農薬が回収できることが示唆された。

文 献

- 1) 環境省中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会 (第 78 回) : 水質汚濁に係る農薬登録基準として環境大臣の定める基準の設定に関する資料, 令和 2 年 11 月 17 日 (2020).
- 2) 農林水産省畜産局長通知: 飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について, 昭和 63 年 10 月 14 日, 63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 3) 財団法人日本食品分析センター: 平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2009).
- 4) 財団法人日本食品分析センター: 平成 23 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 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) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法, 平成 17 年 1 月 24 日, 食安発第 0124001 号 (2005).

6 飼料及び愛玩動物用飼料中の砒素、カドミウム、鉛及び水銀の誘導結合プラズマ質量分析計による迅速・多元素同時分析法の開発

林 菜月*, 元木 太郎*

Development of Rapid Simultaneous Determination Method of Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury in Feed and Pet Food by ICP-MS

HAYASHI Natsuki* and MOTOKI Taro*

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

We have developed a rapid simultaneous quantitative determination method of the concentration of arsenic, cadmium, lead and mercury in feed and pet food using an inductively-coupled-plasma mass spectrometer (ICP-MS).

Having added nitric acid, hydrogen peroxide and gold solution to samples, they were processed by a microwave digestion system. Having further added rhodium and rhenium as internal standard to the digested samples, arsenic, cadmium, lead and mercury were respectively quantified by ICP-MS.

Recovery tests were conducted on alfalfa hay and pet food which includes followings: semi-dry food for dogs; formed jerky for dogs and cats; dried jerky for dogs (hard type); dried jerky for dogs (soft type); confectionery for dogs; and milk powder for cats. The resulting mean recoveries ranged as following: 91.3 % to 109 % for arsenic; 94.5 % to 109 % for cadmium; 85.4 % to 106 % for lead; and 92.7 % to 104 % for mercury. The repeatability in the form of the relative standard deviations (RSD_r) was as following: less than 10 % for arsenic; less than 5.6 % for cadmium; less than 8.1 % for lead; and less than 2.1 % for mercury.

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of arsenic, cadmium, lead and mercury in the present method were determined as 0.02 mg/kg and 0.04 mg/kg, respectively.

Key words: arsenic; cadmium; lead; mercury; inductively-coupled-plasma mass spectrometer (ICP-MS); feed; pet food

キーワード：砒素；カドミウム；鉛；水銀；誘導結合プラズマ質量分析計；飼料；愛玩動物用飼料

1 緒 言

飼料及び愛玩動物用飼料中の有害重金属等（砒素、カドミウム、鉛及び水銀）については、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準¹⁾並びに愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令²⁾において Table 1 のとおり基準値が定められている。

有害重金属等の分析法としては、試料の灰化（砒素及び水銀を除く。）の後、酸による溶解を行い、砒素、カドミウム及び鉛については原子吸光光度計により測定、水銀については還元気化水銀測定装置により測定、愛玩動物用飼料中の無機砒素については液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ質量分析計により測定する方法が飼料分析基準³⁾（以下「飼料分析基準法」という。）及び愛玩動物用飼料等の検査法⁴⁾（以下「PF 検査法」という。）に記載されている。これらの分析法は、

* 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

前処理に時間を要し、測定も元素ごとに個別に行う必要があるため迅速性に欠ける。

近年、食品検査等の分野では、マイクロ波分解装置を用いた前処理時間の短縮化、誘導結合プラズマ質量分析計（以下「ICP-MS」という。）による多元素同時分析が実用化されている。そこで、平成30年度に田端ら⁵⁾は、肥料等試験法⁶⁾及びAOAC Official Method 2015.01⁷⁾を基に有害重金属等のICP-MSによる分析法を開発し、令和元年度に野村ら⁸⁾は、その分析法に一部変更を加え、飼料の一部（配合飼料等）及び愛玩動物用飼料の一部（ドライ製品等）に対する妥当性の検討を実施した。令和2年度に伊藤ら⁹⁾は、令和元年度に実施した選択性の確認において、本法及び飼料分析基準法から得られた定量値に差異が認められた稲わらについて原因究明を実施したが解明に至らなかった。また、乾牧草及び愛玩動物用飼料の一部（ジャーキー等）に対する妥当性を検討したところ、愛玩動物用飼料の一部（ジャーキー等）で良好な結果が得られなかった。

そこで、令和2年度に引き続き、稲わらで認められた定量値の差異について原因究明を実施した。また、愛玩動物用飼料の一部（ジャーキー等）について、妥当性確認で良好な結果が得られなかったことについての原因究明を実施した上で、選択性、真度、精度並びに定量下限及び検出下限を検討し、併せて、乾牧草について定量下限及び検出下限を検討したので、その概要を報告する。

Table 1 Maximum levels of arsenic, cadmium, lead and mercury

Feed types	Maximum levels (feed: mg/kg, pet food: µg/g)			
	Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury
Formula feed	2	0.8	2	0.2
Grass hay (except for rice straw)	2	1	3	0.4
Rice straw	7	1	3	0.4
Fish meal	15	3	7	1
Meat and bone meal	7	3	7	1
Pet foods	2 *	1	3	—

* Total inorganic arsenic (iAs) [iAs (III) + iAs (V)] (come into force on October 1st, 2021)

2 実験方法

2.1 試料

乾牧草（アルファルファ乾草）及び稲わらは目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機 1 で粉砕し、稲わらについては、さらに目開き 0.25 mm のスクリーンを装着した粉砕機 2 で粉砕し、分析用試料とした。愛玩動物用飼料のセミドライ製品、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）及び菓子類は粉砕機 3 で粉砕後、それぞれ目開き 1 mm の篩を通過したものを分析用試料とした。このうち、有姿のままでは粉砕が困難な成形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）は、はさみを用いて裁断したのち粉砕した。粉ミルクはそのまま分析用試料として用いた。

なお、検討に用いた愛玩動物用飼料を Table 2 に示した。

Table 2 Ingredients list of pet foods used in the present study

Pet food types	Ingredients
Semi-dry food for dogs 1	Meats (chicken meal, Japanese black, native chicken, cartilage, etc.), white sugar, beans, wheat flour, defatted rice bran, bread crumbs, sugars, oils and fats, fishes (dried small sardines, etc.), dairy products (cheese, etc.), noodles, dietary fibers, potatoes, vegetables (carrot, broccoli, tomato, pumpkin, etc.), glucosamine (crab-derived), shark cartilage extract (chondroitin-containing), thickening stabilizer (glycerin), minerals (calcium phosphate, calcium carbonate, potassium chloride, magnesium sulfate, sodium chloride, ferrous sulfate, zinc carbonate, copper sulfate, manganese carbonate, calcium iodate), quality improving agent (propylene glycol), preservative (potassium sorbate), vitamins (choline, V. C, V. E, nicotinic acid, pantothenic acid, V. A, V. B ₆ , V. B ₁ , V. B ₂ , V. B ₁₂ , folic acid, V. D), amino acids (L-lysine hydrochloride), acidity regulator, food colors (titanium dioxide, tartrazine, allura red AC, brilliant blue FCF), antioxidants (sodium erythorbate, tocopherol mixture, rosemary extract), flavor
Semi-dry food for dogs 2	Chicken, defatted soybean, corn starch, D-sorbitol, modified starch, glycerin, minerals (Ca, P, Zn, Na, Cu, I), sodium lactate, perilla seasoning, egg yolk powder, sugar, flavor, salt, thickening stabilizer (guar gum), acidity regulator, preservatives (sorbic acid), oil, antioxidant (extracted V. E), vitamins (V.A, V. E, V. D, calcium pantothenate, V. B ₁₂ , V. B ₂), shark cartilage powder, glucosamine, yeast
Formed jerky for dogs	Horse meat, dried mashed potato, sorbitol, starch degradation product, starches, glycerin, casein sodium, ginseng, ganoderma lucidum, royal jelly, chondroitin, glucosamine, oyster shell, adlay, antler, pit viper powder, fish bone, rosemary extracts, preservative (potassium sorbate), sodium phosphate, antioxidants (V. C, V. E)
Formed jerky for dogs and cats	Meats (chicken, chicken breast tender), wheat flour, sugars, starch (wheat starch), beans, sorbitol, glycerin, minerals (Na), acidulant, phosphate (Na), preservative (potassium sorbate), antioxidant (V. C), color former (sodium nitrite), food colors (tartrazine, acid red), seasoning
Dried jerky for dogs (hard type)	Chicken breast tender, preservative (potassium sorbate), antioxidant (sodium sulfate), color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs and cats (hard type)	Anchovy, antioxidant (V. E)
Dried jerky for dogs (soft type)	Chicken breast tender, glycerine, preservative (potassium sorbate), antioxidant (sodium metabisulfite)
Confectionery for dogs	Wheat flour, egg, white sugar, vegetable oil, corn starch, skim milk, casein, brewery yeast, canola oil, oligosaccharide, polysaccharide thickener, glucosamine, salt, minerals (Ca, etc.), vitamins (V. E, V. C, etc.)
Confectionery for dogs and cats	Potato, salmon, white fish, cellulose, tomato, fish digest, vegetable oil, animal fat, salt, L-carnitine, glucosamine, yucca extracts, vitamins (V. A, V. D, V. E, V. B ₁ , V. B ₆ , pantothenic acid, niacin, folic acid, V. B ₂ , V. K, biotin, choline, V. B ₁₂), minerals (Ca, Mn, Cu, Zn, K, Fe, Se), antioxidants (tocopherol, citric acid, rosemary extracts)
Milk powder for cats	Milk protein, animal fat, dried skim milk, vegetable oil, egg yolk powder, milk oligosaccharide, dried yeast, acidity regulator, emulsifier, taurine, L-arginine, L-cystine, DHA, vitamins (V. A, V. D, V. E, V. B ₁ , V. B ₂ , pantothenic acid, niacin, V. B ₆ , folic acid, carotene, biotin, V. B ₁₂ , V. C, choline), minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se), nucleotide, flavor (milk cream)

2.2 試薬

- 1) 塩酸及び硝酸は Ultrapur-100 (関東化学製) を用いた。過酸化水素及び酢酸は Ultrapur (関東化学製) を用いた。L-システイン酸は和光特級 (富士フィルム和光純薬製) を用いた。2.5 の検討において、塩酸、硝酸及び過塩素酸は有害金属測定用 (富士フィルム和光純薬製) を用いた。水は Milli-Q Integral 5 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。
- 2) 希釈溶媒 (10 µg/mL L-システイン酸含有塩酸-酢酸-硝酸-水 (5+6+10+179))
L-システイン酸 10 mg を水 895 mL に溶かし、これに塩酸 25 mL, 酢酸 30 mL 及び硝酸 50 mL を加えた。
- 3) 標準原液
砒素、カドミウム、鉛、水銀、レニウム、ロジウム及び金の標準原液は、Table 3 に示した供給業者、規格のものを用いた。

4) 重金属等混合標準原液

砒素，カドミウム，鉛及び水銀標準原液各 750 μL を 15 mL の定容用チューブに正確に入れて混合し，更に標線まで希釈溶媒を加えて重金属等混合標準原液を調製した（この液 1 mL は，各重金属等としてそれぞれ 5 μg を含有）。

5) 混合内標準液

レニウム及びロジウム標準原液各 75 μL を 15 mL の定容用チューブに入れて混合し，更に標線まで硝酸（1+19）を加えて混合内標準原液を調製した（この液 1 mL は，各内標準としてそれぞれ 5 μg を含有）。さらに混合内標準原液 300 μL を 15 mL の定容用チューブに入れ，標線まで硝酸（1+19）を加えて混合内標準液を調製した（この液 1 mL は，各内標準としてそれぞれ 100 ng を含有）。

6) 金溶液

金標準原液 1.5 mL を 15 mL の定容用チューブに入れ，標線まで硝酸（1+19）を加えて金溶液を調製した（この液 1 mL は，金として 100 μg を含有）。

7) 重金属等混合標準液

重金属等混合標準原液，混合内標準液及び金溶液の一定量を 15 mL の定容用チューブに入れて混合し，更に標線まで希釈溶媒を加えて正確に希釈し，1 mL 中に各重金属等として 0.05, 0.1, 0.4, 0.8, 2, 6 及び 10 ng, 各内標準として 1 ng 並びに金として 200 ng を含有する重金属等混合標準液を調製した。

同時に重金属等混合標準原液を加えずに同様に操作し，各内標準として 1 ng 及び金として 200 ng を含有する濃度 0 ng/mL の重金属等混合標準液を調製した。

測定する際には，Labcon 製チューブに重金属等混合標準液を移した。

Table 3 Standards used in the present study

Heavy metals and others	Guaranteed value ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Manufacturer	Specification
Arsenic standard solution	99.6	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Cadmium standard solution	100.0	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
	100.6		
Lead standard solution	100.3	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Mercury standard solution	100.3	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
	100.7		
Rhenium standard solution	1003	Acros Organics	for atomic absorption spectrochemical analysis
Rhodium standard solution	996	Kanto Chemical	for atomic absorption spectrochemical analysis
Gold standard solution	1004	Kanto Chemical	for atomic absorption spectrochemical analysis

2.3 装置及び器具

1) 粉碎機：

粉碎機 1（稲わら及び乾牧草用）：

SM 100 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，回転数（仕様）1430 rpm）

粉碎機 2（稲わら用）：

ZM 200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）

粉碎機 3（愛玩動物用飼料用）：

GM 200 Retsch 製（使用時回転数 10000 rpm）

2) 高压分解容器：

テトラフルオロメタキシール製分解容器 XF100 Anton-Paar 製

テトラフルオロメタキシール製分解容器 SK-15ET 用 Milestone 製

3) マイクロ波分解装置：

Multiwave 3000 Anton Paar 製

ETHOS EASY Milestone 製

4) チューブ：

定容用チューブ：Digi TUBEs 15 mL, 50 mL ポリプロピレン SCP Science 製

Labcon 製チューブ：MetalFree Centrifuge Tubes with flat caps 15 mL ポリプロピレン Labcon 製

5) メンブランフィルター：DISMIC-25HP（孔径 0.20 μm ，直径 25 mm，親水性 PTFE）東洋濾紙製

6) ICP-MS：

オートサンプラー部：ASX-560 Teledyne Technologies 製

誘導結合プラズマ質量分析計部：iCAP RQ ICP-MS Thermo Fisher Scientific 製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 0.5 g を正確に量って高压分解容器に入れ，硝酸 5 mL，過酸化水素 2 mL 及び金溶液 0.4 mL を加え，発泡がおさまった後マイクロ波分解装置を用いて分解時の温度が約 200 °C となるよう分解プログラムを設定し試料を分解した．分解プログラムの設定は Table 4 に示すとおり．冷却後，分解液を 15 mL の定容用チューブに水で移し込み，更に定容用チューブの標線まで水を加え，1700 \times g で 5 分間遠心分離した．上澄み液 3.75 mL 及び混合内標準液 0.5 mL を 50 mL の定容用チューブに正確に入れ，希釈溶媒を定容用チューブの標線まで加え，必要に応じてメンブランフィルターでろ過し，ICP-MS による測定に供する試料溶液とした．同時に試料を用いないで同一の操作を行い，空試験溶液を調製した．

測定する際は，Labcon 製チューブに試料溶液及び空試験溶液を移した．

Table 4 Operation conditions of Anton Paar's and Milestone's microwave digestion

Step	Anton Paar	Milestone	Time (min)
	Power (W)	Temperature (°C)	
Step 1 (Heating)	0 → 1400	30 → 200	10
Step 2 (Fixed electric power)	1400	200	40
Step 3 (Cooling)	0	200 → 30	30

2) ICP-MS による測定

試料溶液、各重金属等混合標準液及び空試験溶液を ICP-MS に導入し、各モニターイオンにおけるイオンカウント値を得た。測定条件を Table 5 に示した。

Table 5 Operation conditions of ICP-MS

Nebulizer gas	Ar (1.08 L/min)
Plasma gas	Ar (14.0 L/min)
Auxiliary gas	Ar (0.80 L/min)
Collision gas	He (4.34 L/min)
High-frequency output	1550 W
Monitor ion	^{75}As (m/z 75), ^{114}Cd (m/z 114), ^{208}Pb (m/z 208), ^{202}Hg (m/z 208), ^{103}Rh (m/z 103), ^{187}Re (m/z 187)

3) 計 算

得られたイオンカウント値から砒素及びカドミウムはロジウムで、鉛及び水銀はレニウムで内標準補正し、試料中の砒素、カドミウム、鉛及び水銀量を算出した。

空試験溶液について、正の値が得られた場合は結果を差し引いた。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Sample 0.5 g (tetrafluoromethaxil vessel)

- added 5 mL of nitric acid and 2 mL of hydrogen peroxide
- added 0.4 mL of Au solution

Microwave digestion

- transferred the digested sample solution to 15 mL volumetric tube
- washed the tetrafluoromethaxil vessel with water
- transferred the water to the above 15 mL volumetric tube
- filled up to 15 mL with water
- centrifuged for 5 min at 1700×g
- transferred 3.75 mL of supernatant to 50 mL volumetric tube
- added 0.5 mL of internal standard (Rh, Re)
- filled up to 50 mL with a mixture of hydrochloric acid, acetic acid, nitric acid and water (5:6:10:179) containing 10 µg/mL L-cysteine acid
- filtered through a hydrophilic PTFE membrane filter (pore size: 0.20 µm)
if necessary

ICP-MS

Scheme 1 Analytical procedure for arsenic, cadmium, lead and mercury in feed and pet food

2.5 稲わら中のカドミウム分析法の検討方法

1) 灰化時の温度による定量値への影響の確認

令和元年度及び令和2年度の検討で用いた稲わらについて、5.0 g を 100 mL のトールビーカーに入れ、基準値相当量のカドミウムを添加し、穏やかに加熱して炭化させた後、400 °C で 8 時間及び 15 時間、480 °C で 15 時間加熱して試料を灰化させた。その後、飼料分析基準第 4 章第 1 節 12.2 に従い操作し、試料中のカドミウム量を測定した。

同時に試料を用いないで同一の操作を行い、空試験溶液を調製した。空試験溶液について、正の値が得られた場合は結果を差し引いた。

また、同時にカドミウムを添加しないで同一の操作を行い、ブランク溶液を調製し、回収率はブランク値を差し引いて算出した。

2) 分解操作の改善方法の検討

稲わら 2.0 g を 500 mL のトールビーカーに入れ、2.5 mg/kg 相当量のカドミウムを添加し、穏やかに加熱して炭化させた後、400 °C で 8 時間加熱して試料を灰化させた。灰化した試料に硝酸 5 mL 及び過塩素酸 5 mL を加え、時計皿で覆い、砂浴上でほとんど乾固するまで分解した。その後、飼料分析基準第 4 章第 1 節 12.2 に従い操作し、試料中のカドミウム量を測定した。

同時に試料を用いないで同一の操作を行い、空試験溶液を調製した。空試験溶液について正の値が得られた場合は、結果を差し引いた。

また、同時にカドミウムを添加しないで同一の操作を行い、ブランク溶液を調製し、回収率はブランク値を差し引いて算出した。

2.6 添加回収試験

2.2 の 4) の重金属等混合標準原液を希釈溶媒で正確に希釈し添加に用いた。

乾牧草（アルファルファ乾草）及び愛玩動物用飼料（セミドライ製品（犬用））、成型ジャーキ

ー（犬猫用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬用及びソフトタイプ犬用），菓子類（犬用及び粉ミルク（猫用））について，各重金属等をそれぞれ添加後よく混合し，一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し，平均回収率及び繰り返し精度を求めた。

また，同時に重金属等を添加しないで同一の操作を行い，ブランク溶液を調製し，回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

なお，愛玩動物用飼料への添加回収試験において，砒素の高濃度側の添加濃度は，改正前の総砒素としての基準値相当である 15 mg/kg とした。また，愛玩動物用飼料において水銀の基準値は定められていないため，高濃度側の添加濃度は，愛玩動物用飼料の原材料を考慮し，魚粉，肉粉及び肉骨粉の基準値相当である 1 mg/kg とした。

3 結果及び考察

3.1 稲わら中のカドミウム分析法の検討

令和元年度に実施した選択性の確認において，本法及び飼料分析基準法に従い稲わら中のカドミウムの定量値を求めたところ，それぞれ 0.211 mg/kg 及び 0.175 mg/kg となり⁸⁾，差異が見られたことから，1)及び2)により原因を調べるとともに，その改善方法を検討した。

1) 灰化時の温度による定量値への影響の確認

2.5 の 1)に従い分析した結果，稲わらを 400 °C で 8 時間加熱した場合のブランク値は 0.183 mg/kg，回収率は 92.4 %，15 時間加熱した場合のブランク値は 0.188 mg/kg，回収率は 86.3 %，480 °C で 15 時間加熱した場合のブランク値は 0.134 mg/kg，その回収率は 58.3 %であり，温度が高いほど定量値及び回収率が低くなる傾向がみられた。なお，令和元年度の定量値（0.175 mg/kg）は，当センターで分析を行う際の設定値である 480 °C で 10 時間加熱したときの値である。

2) 分解操作の改善方法の検討

1)の検討において，飼料分析基準法で定められた乾式分解の温度条件である 500 °C 以下であっても，温度が高すぎるとカドミウムの定量値及び回収率が低くなることがわかったが，この原因は，高温で加熱することで稲わらに含まれるケイ酸とカドミウムが結合し，水に不溶化したためと考えられた¹⁰⁾。一方で，温度を下げるとカドミウムの損失は小さくなるが，残存有機物を含まない灰分を得ることは非常に困難となる。飼料分析法・解説¹¹⁾によると，試料の分解が不十分な場合，灰化後に硝酸及び過塩素酸を用いた湿式分解を行うこととしていることから，1)の検討においてカドミウムの損失が小さかった 400 °C で 8 時間灰化した稲わらについて，2.5 の 2)に従い湿式分解を追加して分析した。その結果，灰化後に湿式分解を追加した場合のブランク値は 0.215 mg/kg，回収率は 95.6 %であった。これは，1)で湿式分解をしなかった場合の定量値（0.183 mg/kg）よりも高くなり，本法の定量値（0.211 mg/kg）⁸⁾と同程度の値であった。

以上 1)及び 2)の結果について，本法及び飼料分析基準法で稲わら中のカドミウムの定量値に差異が見られた原因として，飼料分析基準法において，灰化時に稲わら由来のケイ酸とカドミウムが結合して不溶化した可能性が考えられたが，400 °C で灰化した後，硝酸及び過塩素酸で湿式分解をすることで，本法と同程度の定量値を得ることができた。

従って，本法により得られた定量値は自然汚染のものであり，定量に影響するような妨害はな

く、本法の選択性に問題はなかったと考えられた。

3.2 高压分解容器の洗浄方法の検討

令和2年度の検討において、愛玩動物用飼料（素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬用）及び粉ミルク（猫用））を用いた添加回収試験を実施した結果、PF 検査法第11章試験法の妥当性確認法（以下「PF 検査法の妥当性確認法」という。）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たさなかった。この原因の一つとして、高压分解容器に汚れが残留し、定量値に影響を与えていたことが考えられた。以前は、取扱説明書に従い、洗浄試薬として硝酸を用いてマイクロ波加熱による洗浄を行い、放冷後、超純水ですすいでいたが、本法の場合は硝酸のみでは洗浄が不十分となり、高压分解容器内部に重金属等が蓄積し、加熱時に再溶出することにより定量値にばらつきが出たと考えられた。そこで、高压分解容器の洗浄方法を次のとおりに変更し、その効果を確認した。洗浄試薬として王水又は逆王水を用い、マイクロ波分解装置の取扱説明書に従い、マイクロ波加熱による洗浄を行った。洗浄後は硝酸（1+3）に一晩浸漬した後、超純水ですすいだ。その結果、3.4で示すように良好な結果が得られ、王水又は逆王水を用いることで効果的に洗浄可能であることがわかった。

3.3 選択性の確認

愛玩動物用飼料のセミドライ製品（犬用）、成型ジャーキー（犬用）、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬猫用及びソフトタイプ犬用）、菓子類（犬猫用）及び粉ミルク（猫用）について、PF 検査法により重金属等が検出された試料の各 1 検体を本法により分析し、試料由来の妨害物質が各重金属等の定量に及ぼす影響を調査した。ただし、粉ミルクについては重金属等が検出された試料が無かったため不検出の試料を 1 検体用いた。

その結果は Table 6 のとおり、2 法で検出されたが定量値に差がある元素及び本法でのみ検出された元素があった。砒素については、成型ジャーキー（犬用）においては本法でのみ検出されたが PF 検査法の検出下限値未満の値であった。また、素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ犬用）の定量値は 2 法間で差が見られたが PF 検査法の定量下限値未満の値であった。カドミウムについては、粉ミルクにおいては本法でのみ検出されたが PF 検査法の検出下限未満の値であった。鉛については、すべての試料において本法でのみ検出されたが PF 検査法の検出下限未満の値であった。水銀については、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬猫用）の定量値は 2 法間で差が見られたが、PF 検査法の定量下限付近の値であった。また、セミドライ製品（犬用）、成型ジャーキー（犬用）及び素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ犬用）において本法でのみ水銀が検出されたが、いずれも PF 検査法の検出下限未満の値であった。以上の結果について、定量下限未満の値はばらつきがあることを考慮すると、本法により得られた定量値は分析対象の自然汚染のものと考えられ、定量に影響するような妨害はなく、本法の選択性に問題はないと考えられた。

Table. 6 Quantitative results of this method and inspection method for pet food

Sample types	Analytical methods	Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury
		Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)
Semi-dry type for dogs 1	This method	0.388 ^{b)}	0.054 ^{b)}	0.040 ^{b)}	0.003 ^{b)}
	Inspection method for pet foods	0.406	(0.080) ^{a)}	<LOD ^{a)}	<LOD ^{a)}
Formed jerky for dogs	This method	0.037 ^{b)}	0.060 ^{b)}	0.031 ^{b)}	0.001 ^{b)}
	Inspection method for pet foods	<LOD	(0.071) ^{a)}	<LOD ^{a)}	<LOD ^{a)}
Dried jerky for dogs and cats (hard type)	This method	7.65 ^{b)}	0.108 ^{b)}	0.103 ^{b)}	0.037 ^{b)}
	Inspection method for pet foods	7.62	0.100 ^{a)}	<LOD ^{a)}	0.062
Dried jerky for dogs (soft type)	This method	0.114	ND	0.008	0.004
	Inspection method for pet foods	(0.066)	<LOD ^{a)}	<LOD ^{a)}	<LOD
Confectionery for dogs and cats	This method	0.435 ^{a)}	0.160 ^{a)}	0.139 ^{a)}	0.033 ^{a)}
	Inspection method for pet foods	0.445	0.164 ^{a)}	<LOD ^{a)}	(0.024) ^{a)}
Milk powder for cats	This method	0.010	0.015	0.010	ND
	Inspection method for pet foods	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD ^{a)}
Analytical standards method and inspection method for pet food	Limit of quantification (LOQ) (mg/kg)	0.2	0.1	0.5	0.03
	Limit of detection (LOD) (mg/kg)	0.05	0.03	0.2	0.02

Except where noted: Mean ($n = 1$)

a) Mean ($n = 2$)

b) Mean ($n = 3$)

(): Less than the limit of quantification

ND: Not detected

<LOD: Less than the limit of detection

3.4 添加回収試験

2.6 により添加回収試験を実施した。結果は、Table 7 のとおり、砒素については平均回収率 91.3~109 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 10 %以下，カドミウムについては平均回収率 94.5~109 %， RSD_r は 5.6 %以下，鉛については平均回収率 85.4~106 %， RSD_r は 8.1 %以下，水銀については平均回収率 92.7~104 %， RSD_r は 2.1 %以下の成績が得られ，飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）及び PF 検査法の妥当性確認法に定められた 1)及び 2)の真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

1) 真度 :

70 %以上 120 %以下 (飼料)

60 %以上 115 %以下 (愛玩動物用飼料における添加濃度 0.04 mg/kg)

80 %以上 110 %以下 (同 1 mg/kg, 3 mg/kg, 15 mg/kg)

2) 精度 :

22 %以下 (添加濃度 0.04 mg/kg)

16 %以下 (同 1 mg/kg)

14 %以下 (同 3 mg/kg)

11 %以下 (同 15 mg/kg)

Table 7 Recoveries for arsenic, cadmium, lead and mercury

Sample types	Arsenic				Cadmium			
	Natural contamination	Spiked level	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Natural contamination	Spiked level	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)
Alfalfa hay	0.035	0.04	101	2.0	0.061	0.04	104	3.1
Semi-dry food for dogs 2	0.214	0.04	91.3	10	0.047	0.04	109	5.6
	0.167	15	102	1.1	0.043	1	97.7	0.8
Formed jerky for dogs and cats	0.007	0.04	99.6	2.4	0.025	0.04	102	1.3
	ND	15	98.2	1.1	0.020	1	94.7	0.2
Dried jerky for dogs (hard type)	0.011	0.04	103	2.5	ND	0.04	105	0.9
	ND	15	102	0.5	ND	1	98.9	0.7
Dried jerky for dogs (soft type)	0.114	0.04	109	3.9	ND	0.04	102	0.9
	0.083	15	101	1.9	ND	1	97.0	2.2
Confectionery for dogs	0.004	0.04	98.2	2.2	0.015	0.04	100	1.5
	ND	15	96.2	2.4	0.007	1	94.5	2.5
Milk powder for cats	0.010	0.04	101	2.1	0.015	0.04	106	1.0
	ND	15	103	0.5	0.008	1	100	0.8

Sample types	Lead				Mercury			
	Natural contamination	Spiked level	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Natural contamination	Spiked level	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)
Alfalfa hay	0.039	0.04	85.4	2.3	0.004	0.04	95.3	1.4
Semi-dry food for dogs 2	0.147	0.04	106	8.1	ND	0.04	95.4	0.7
	0.139	3	95.4	0.7	ND	1	99.3	0.3
Formed jerky for dogs and cats	0.003	0.04	97.5	1.8	0.0001	0.04	93.0	0.9
	ND	3	95.9	2.6	ND	1	100	2.1
Dried jerky for dogs (hard type)	0.006	0.04	104	5.8	ND	0.04	92.7	0.9
	ND	3	97.4	0.5	ND	1	100	1.1
Dried jerky for dogs (soft type)	0.008	0.04	97.8	2.3	0.004	0.04	94.9	1.1
	0.002	3	97.6	1.5	ND	1	99.5	1.5
Confectionery for dogs	0.006	0.04	101	5.7	ND	0.04	94.9	0.8
	ND	3	96.4	1.9	ND	1	97.0	1.4
Milk powder for cats	0.010	0.04	96.8	3.8	ND	0.04	94.1	0.9
	0.002	3	98.2	0.5	ND	1	104	1.4

a) $100 \times (\text{mean of quantitative values of the five samples} - \text{natural contamination}) / \text{spiked level}$

b) Relative standard deviation of repeatability

ND: Not detected

3.5 定量下限及び検出下限

乾牧草（アルファルファ乾草）及び愛玩動物用飼料（セミドライ製品（犬用）、成型ジャーキー（犬猫用）、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬用及びソフトタイプ犬用）、菓子類（犬用）及び粉ミルク（猫用））について、各重金属等の検量線が直線性を示した範囲、各 0.05~10 ng/mL の下端付近となる濃度（0.04 mg/kg 相当量（最終試料液中濃度 0.1 ng/mL 相当量））における添加回収試験を実施したところ、その結果は良好であり、かつ、標準偏差の 10 倍は当該濃度を超えていなかった。従って各重金属等の定量下限の濃度は 0.04 mg/kg とした。

また、検出下限は、先の標準偏差に自由度 4、片側有意水準 0.05 の Student の t -値を乗じた値の 2 倍（= 4.26）、すなわち定量下限の 4.26/10 倍、0.02 mg/kg とした。

この定量下限及び検出下限の濃度は乾牧草（稲わらを除く）中の重金属等の管理基準値に対して 1/10 以下及び 1/20 以下、愛玩動物用飼料の重金属等の基準値に対して 1/10 以下及び 1/20 以下であり、妥当性確認法ガイドライン及び PF 検査法の妥当性確認法に定められた 1)及び 2)の基準値に対する定量下限及び検出下限の目標値を満たしていた。

- 1) 定量下限：1/5（飼料及びウェット製品以外の愛玩動物用飼料）
- 2) 検出下限：1/10（飼料及びウェット製品以外の愛玩動物用飼料）

4 まとめ

飼料分析基準法と本法とでカドミウムの定量値に差異が見られた稲わらについて、その原因究明を行った。また、平成 30 年度に開発し、令和元年度に一部変更を加えた有害重金属等の ICP-MS による迅速・多元素同時分析法の飼料及び愛玩動物用飼料への適用について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 飼料分析基準法と本法とで稲わらのカドミウムの定量値に差異がみられた原因として、飼料分析基準法において、灰化時に稲わら由来のケイ酸とカドミウムが結合して不溶化したと考えられたが、400 °C で灰化後、硝酸及び過塩素酸で湿式分解をすることで、本法と同程度の定量値を得ることができた。従って、本法により得られた定量値は自然汚染のものであり、定量に影響するような妨害ではなく、本法の選択性に問題はなかったと考えられた。
- 2) 高压分解容器の洗浄試薬について、硝酸のみではなく、王水または逆王水を用いることが効果的であることがわかった。
- 3) 愛玩動物用飼料の一部（セミドライ製品（犬用）、成型ジャーキー（犬用）、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬猫用及びソフトタイプ犬用）、菓子類（犬猫用）及び粉ミルク（猫用））について、本法により試料中の各重金属等の量を算出した結果、各重金属等が検出されたが、本法で得られた定量値は分析対象の自然汚染のものと考えられ、本法の選択性に問題はないと考えられた。
- 4) 乾牧草（アルファルファ乾草）及び愛玩動物用飼料の一部（セミドライ製品（犬用）、成型ジャーキー（犬猫用）、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬用及びソフトタイプ犬用）、菓子類（犬用）及び粉ミルク（猫用））について各重金属等を添加し、本法に従って 5 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、妥当性確認法ガイドライン及び PF 検査法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。

- 5) 本法の各重金属等の定量下限の濃度は 0.04 mg/kg, 検出下限は 0.02 mg/kg であった. 設定した定量下限及び検出下限は, 妥当性確認法ガイドライン及び PF 検査法の妥当性確認法に定められた目標値を満たしていた.

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知: 飼料の有害物質の指導基準及び管理基準の制定について, 昭和 63 年 10 月 14 日, 63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 2) 農林水産省令・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).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知: 飼料分析基準の制定について, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).
- 4) 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).
- 5) 田端 麻里, 野村 昌代, 鈴木 知華: 飼料及び愛玩動物中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発, 飼料研究報告, 44, 95-104 (2019).
- 6) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター: 肥料等試験法 (2019).
- 7) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, AOAC official method 2015.01 heavy metals in food. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 8) 野村 昌代, 伊藤 紗織, 田端 麻里: 飼料及び愛玩動物中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発, 飼料研究報告, 45, 67-83 (2020).
- 9) 伊藤 紗織, 林 菜月: 飼料及び愛玩動物中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発, 飼料研究報告, 46, 45-56 (2021).
- 10) 久保 彰治: 無機分析のための生体試料の分析法, 分析化学, 11, 864-871 (1964).
- 11) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター飼料分析基準研究会, 飼料分析法・解説, I, 95-100 (2009).

7 カルタップの液体クロマトグラフ質量分析計による分析法の妥当性確認 ～イアコーンサイレージへの適用～

加藤 耕一*, 嘉手苺 舞*, 桑原 正良*

Validation Study of Determination Method of Cartap by LC-MS ~Application to Ear Corn Silage~

KATO Koichi*, KADEKARU Mai* and KUWABARA Masayoshi*

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

We have made a validation study on application of a cartap determination method, which had been validated for corn and grass hay, to ear-corn silage (ECS). The method, which uses a liquid-chromatograph electrospray-ionization mass spectrometer (LC-ESI-MS), has been listed in the Feed Analysis Standard of Japan.

Cartap in ECS was extracted with hydrochloric acid (1:100) containing 1 w/v% L-cysteine hydrochloride monohydrate, and cartap was hydrolyzed to nereistoxin with nickel (II) chloride and ammonia. The sample solution was purified with Chem Elut (volume: 50 mL) (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) and injected into an LC-MS to determine the concentration of cartap. The LC separation was then carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 3.5 μm, Agilent Technologies Inc.) with 1 v/v% heptafluorobutyric acid solution-methanol (4:1) as a mobile phase. In the MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

As documented in the previous report, recovery test results on ECS and corn were both low. The cause investigation result indicated that acetone-diethylene glycol (49:1) added as a keeper to prevent vaporization of nereistoxin might have caused the low recovery rate because of ionization inhibition at mass spectrometry.

New recovery tests were conducted on ECS, applying the reduced volume of the keeper to 0.03 mL. ECS was added with 0.0175 and 0.614 mg/kg of cartap. The resulting mean recoveries ranged from 79.7 % to 83.7 %, and the repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 6.9 %. The reduced volume of the keeper to 0.03 mL was verified as effective for cartap recovery test.

This method was thus validated as useful for inspections of cartap in ECS.

Key words: cartap; nereistoxin; liquid-chromatograph mass spectrometer (LC-MS); electrospray ionization (ESI); ear-corn silage; corn

キーワード：カルタップ；ネライストキシン；液体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；イアコーンサイレージ；とうもろこし

1 緒 言

カルタップは、武田薬品工業が開発したネライストキシンをリード化合物とする殺虫剤であり、

* 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

国内では 1967 年に初回農薬登録されている¹⁾。国内における飼料中の残留基準値（カルタップ、ベンズルタップをカルタップ含量に換算したもの及びチオシクロラムをカルタップ含量に換算したものの総和）は、えん麦，大麦，小麦，とうもろこし，マイロ及びライ麦で 0.2 mg/kg 並びに牧草で 0.7 mg/kg と定められている²⁾。

カルタップの分析法は，アンモニア塩基性条件下で加水分解することでカルタップをネライストキシシンに変換した後，多孔性ケイソウ土カラムで精製し，液体クロマトグラフ質量分析計（以下「LC-MS」という。）により定量する方法（以下「飼料分析基準収載法」という。）が飼料分析基準³⁾に収載されている。

近年，食料自給率向上の重点的な施策の取組の一つとしてイアコーンサイレージ（とうもろこしの子実，芯及び外皮から調製したサイレージ。以下「ECS」という。）の生産及び利用が推進されているところである。ECS の利用推進を図るためにはその安全性の確保が重要であるが，飼料分析基準収載法は，ECS における妥当性が確認されておらず，カルタップの残留実態が把握できない状況にあることから，飼料分析基準収載法の ECS への適用拡大が喫緊の課題となっている。

そこで，令和 2 年度に関口ら⁴⁾は，飼料分析基準収載法の ECS への適用の可否について検討したところ低回収率となり，飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度の目標値を満たさなかった。また，既に妥当性が確認されているとうもろこしにおいても同様に低回収率となった。これは減圧濃縮・乾固による損失及び質量分析におけるイオン化阻害が主な原因と考えられた。

今回，この原因究明を行い，飼料分析基準法について ECS に適用拡大するための検討を行ったので概要を報告する。

参考にカルタップ及びネライストキシシンの構造式等を Fig. 1 に示した。

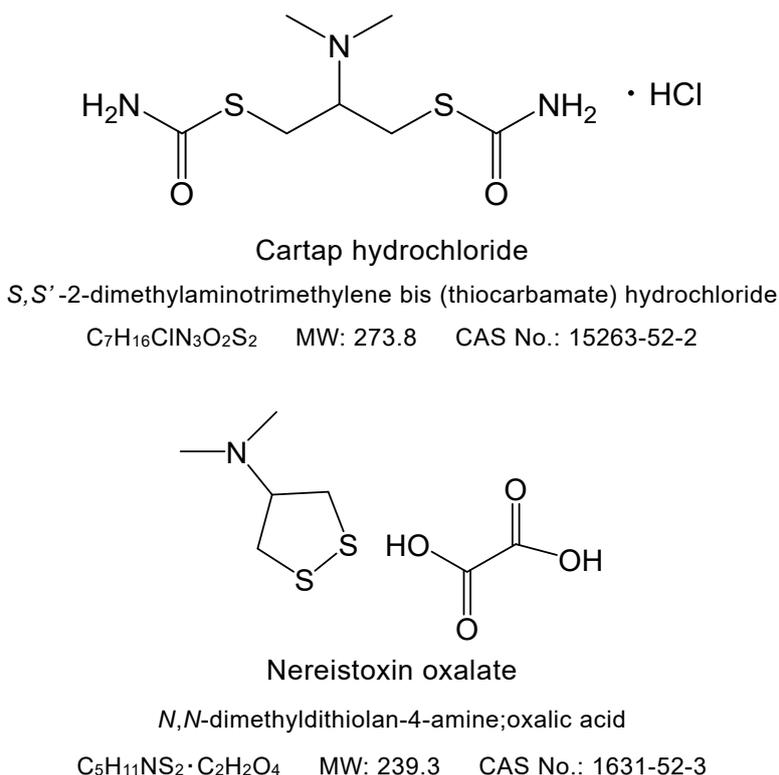


Fig. 1 Chemical structures of cartap hydrochloride and nereistoxin oxalate

2 実験方法

2.1 試料

ECS は、60 °C で 6 時間乾燥した後、更に室内に静置して風乾した。これを目開き 1 mm のスクリーンを装着したカッティングミルで粉砕し、分析用試料とした。

低回収率の原因究明に用いたとうもろこし（子実のみ）は、目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し、分析用試料とした。

2.2 試薬

1) アセトン及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは LC-MS 用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。L-システイン塩酸塩一水和物、塩化ニッケル（II）（無水）、塩酸、アンモニア水（質量分率 28~30 %）及びジエチレングリコールは試薬特級を用いた。水は、LC-MS 用（富士フイルム和光純薬製）又は Milli-Q Element A-10（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) ヘプタフルオロ酪酸溶液

ヘプタフルオロ酪酸液（東京化成製，Ion-Pair Reagent for LC-MS（約 0.5 mol/L 溶液））10 mL を水に溶かして 1 L とし、用事調製した。

3) ネライストキシン標準液

ネライストキシンシュウ酸塩（富士フイルム和光純薬製，残留農薬試験用，純度 98 %）64.1 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてネライストキシン標準原液を調製した（この液 1 mL は，ネライストキシンとして 0.4 mg を含有）。

使用に際して、ネライストキシシン標準原液 5 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、更に標線までメタノールを加え、1 mL 中にネライストキシシンとして 20 µg を含有する液を調製した。この液の一定量をヘプタフルオロ酪酸溶液-メタノール (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中にネライストキシシンとしてそれぞれ 0.2, 2, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 及び 200 ng を含有する各検量線用標準液を用事調製した。

マトリックス効果の確認試験では、同様に 1 mL 中にネライストキシシンとして 191 ng を含有する標準液を用事調製した。

4) カルタップ標準液

カルタップ塩酸塩標準品 (富士フィルム和光純薬製, 残留農薬試験用, 純度 98 %) 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてカルタップ標準原液を調製した (この液 1 mL は、カルタップとして 0.5 mg を含有)。

試料への添加には、カルタップ標準原液をメタノールで正確に希釈してカルタップ標準液を用事調製した。

5) 抽出溶媒

L-システイン塩酸塩一水和物 10 g を塩酸 (1+100) に溶かして 1 L とし、用事調製した。

6) 塩化ニッケル溶液

塩化ニッケル (II) (無水) 2 g を水に溶かして 100 mL とした。

2.3 装置及び器具

- 1) カッティングミル : SM-2000 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 835 rpm)
- 2) 粉碎機 : ZM-200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)
- 3) 振り混ぜ機 : MW-DRV 宮本理研工業製 (使用時振とう数 300 rpm)
- 4) 多孔性ケイソウ土カラム : Chem Elut (50 mL 保持用) Agilent Technologies 製
- 5) LC-MS :

LC 部 : Prominence 島津製作所製

MS 部 : LCMS-2010EV 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 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液 20 mL を 200 mL の共栓三角フラスコに正確に入れ、アルカリ加水分解に供する試料溶液とした。

2) アルカリ加水分解

試料溶液に塩化ニッケル溶液 2 mL 及びアンモニア水 5 mL を加えた後 15 分間振り混ぜ、カルタップをネライストキシシンに加水分解し、カラム処理に供する試料溶液とした。

3) カラム処理

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。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていた三角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た。液面が充てん剤の上端に達するまで流下させてネライストキシシンを

溶出させ、更にヘキサン 120 mL をカラムに加えて同様に溶出させた後、溶出液にキーパーとして、アセトン-ジエチレングリコール (49+1) 0.03 mL を添加した。溶出液を 37 °C 以下の水浴で約 2 mL まで 280 hPa 圧力条件で減圧濃縮した後、37 °C 以下で保温し、乾固した。ヘプタフルオロ酪酸溶液-メタノール (4+1) 4 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、上澄み液を LC-MS による測定に供する試料溶液とした。

4) LC-MS による測定

試料溶液及び各検量線用標準液 2 µL を LC-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 Operation conditions of LC-MS

Column 1	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3.5 µm), Agilent Technologies
Column 2	VP-ODS (2.0 mm i.d. × 150 mm, 4.6 µm), Shimadzu
Mobile phase	1 v/v% heptafluorobutyric acid solution-methanol (4:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N ₂ (1.5 L/min)
Drying gas	N ₂ (10 L/min)
Heat block temperature	200 °C
CDL temperature	250 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 150

5) 計算

得られた SIM クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のネライストキシン量を算出し、これに 1.83 を乗じて試料中のカルタップ量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Sample 10.0 g (200 mL Erlenmeyer flask)

- added 100 mL of 1 w/v% L-cysteine hydrochloride monohydrate solution in hydrochloric acid (1:100)
- shook for 30 min
- centrifuged for 5 min at 650×g
- transferred 20 mL of supernatant to 200 mL Erlenmeyer flask

Alkaline hydrolysis

- added 2 mL of 2 w/v% nickel chloride (II)
- added 5 mL of 28 v/v% ammonia water
- shook for 15 min

Chem Elut (volume: 50 mL)

- applied sample solution and allowed to stand for 10 min
- placed receiver (300 mL of evaporator flask)
- washed 200 mL of Erlenmeyer flask with 10 mL of hexane (3 times)
- eluted with 120 mL of hexane
- added 0.03 mL of acetone-diethylene glycol (49:1)

Evaporated to 2 mL at 280 hPa under 37 °C and dried under 37 °C

- added 4 mL of 1 v/v% heptafluorobutyric acid solution-methanol (4:1)
- centrifuged for 5 min at 5000×g

LC-MS

(Cartap is quantified as nereistoxin. Concentration of cartap = Concentration of nereistoxin × 1.83.)

Scheme 1 Analytical procedure for cartap in ECS

2.5 低回収率の原因究明

- 1) とうもろこしに、カルタップとして 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でネライストキシンとして 55 ng/mL）になるように 2.2 の 4) で調製したカルタップ標準液を添加後よく混合した。この直後に抽出溶媒を加え、2.4 の 1) から 3) に従って操作し、濃縮前にキーパーを 0.5 mL（飼料分析基準収載法の添加量）及び 2 mL の 2 条件で添加し、それぞれの試料溶液を調製した。各試料溶液及び各 2 倍希釈試料溶液（ヘプタフルオロ酪酸溶液-メタノール (4+1) で 2 倍希釈した溶液）を 2.4 の 4) から 5) に従って定量した。
- 2) 1) と同様に、キーパーの添加量を 0 mL（添加無し）、0.1 mL、0.3 mL 及び 0.5 mL とした試験を実施した。

2.6 キーパー添加量の検討

とうもろこしに、カルタップとして 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でネライストキシンとして 55 ng/mL）になるように 2.2 の 4) で調製したカルタップ標準液を添加後よく混合した。この直後に抽出溶媒を加え、2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、キーパーの添加量は 0.03 mL、0.1 mL 及び 0.5 mL の 3 条件で添加回収試験を行った。

2.7 ECS での添加回収試験

ECS に、カルタップを原物換算して 0.0175 及び 0.614 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でネライストキシンとして 5.5 ng/mL 及び 191 ng/mL）となるように 2.2 の 4) で調製したカルタップ標準液をそれぞれ添加後よく混合した。この直後に抽出溶媒を加え、2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。なお、ECS への添加は風乾物試料に対しカルタップとして 0.02 及び 0.7 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を

30%及び20%と想定して、原物（水分含有量30%）中濃度＝風乾物（水分含有量20%）中濃度／1.14の式により行った。

3 結果及び考察

3.1 低回収率の原因究明

令和2年度に実施したとうもろこしによる添加回収試験で、低回収率となった原因の一つと考えられたイオン化阻害について、①HPLCカラムの違い、②最終試料溶液の希釈の有無により軽減されるか確認した。また、減圧濃縮前に加えるキーパーの添加量を増やすことで、目的成分の揮散が抑えられ、損失が低減されるのではないかと考え、上記確認と併せて2.5の1)に従ってとうもろこしによる添加回収試験を行った。

その結果はTable 2のとおりであり、カラム2よりもカラム1の回収率が僅かに高く、最終試料溶液の希釈による回収率の改善は認められなかった。また、キーパーの添加量を増やすことにより、大幅に回収率が低下した。

このことから、HPLCカラムの変更や最終試料溶液の希釈による改善効果は低く、また、キーパーの添加量を増やすことでの改善は認められず、逆に悪化したため、キーパーによるイオン化阻害が疑われた。

Table 2 Effect of amount of keeper and dilution on recoveries

Keeper amount (mL)	Dilution	Recovery ^{a)} (%)	
		Column 1	Column 2
0.5	No	68.4	56.9
	Yes	54.6	35.2
2	No	39.3	27.0
	Yes	41.1	—

—: Not tested

a) Mean ($n = 2$)

この結果を踏まえ、キーパーの添加量を減らすことで、回収率の改善を図ることとした。そこで、2.5の2)により操作を行ったところ、その結果はTable 3のとおり、キーパーの添加量が増加するに従い、回収率が低下した。一方で、キーパー添加なしの場合は添加した場合に比べて回収率が低かった。

このことから、キーパーはネライストキシンの揮散を防ぐ効果はあるものの、一定量以上の添加によって回収率が低下することから、キーパーによるイオン化阻害の可能性が示唆された。

なお、以後の検討はカラム1を用いて行うこととした。

Table 3 Effect of keeper amount on recoveries

Keeper amount (mL)	Recovery ^{a)} (%)
0	58.7
0.1	76.5
0.3	62.8
0.5	57.7

a) $n = 1$

3.2 キーパー添加量の検討

最適なキーパー添加量を検討するため、2.6 に従い、とうもろこしでの添加回収試験を行った。その結果は Table 4 のとおりであり、キーパーの添加量を 0.03 mL とすることでとうもろこしにおける低回収率が改善され、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす結果が得られたことから、同様の条件で ECS での検討を行うこととした。

Table 4 Recoveries for cartap from maize

Keeper amount (mL)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.03	77.0	12
0.1	66.4	13
0.5	57.1	4.8

a) Mean ($n = 6$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.3 妨害物質の検討

ECS を用い、2.4 の 1) から 4) に従って得られた SIM クロマトグラムを確認した結果、定量を妨げるピークは認められなかった。

本検討により得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

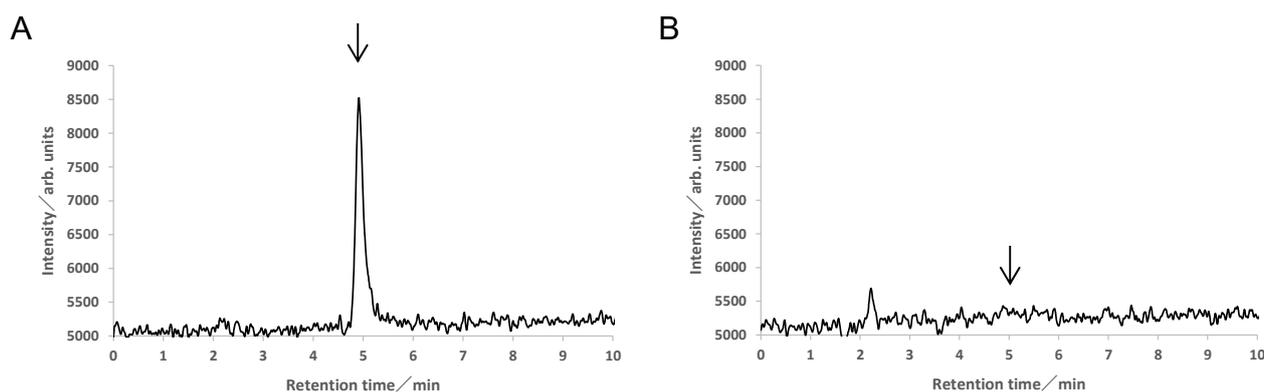


Fig. 2 Typical selected ion monitoring (SIM) chromatograms of nereistoxin in standard and blank sample solution (LC-MS conditions are shown in Tables 1. Arrows indicate the peaks of nereistoxin.)

A: Standard solution (5.5 ng/mL as nereistoxin)

B: Sample solution of ECS (blank)

3.4 マトリックス効果の確認

2.4の1)から3)に従って調製したECSのブランク試料溶液にネライストキシンとして191 ng/mL相当量（風乾物試料中のカルタップ 0.7 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3)に従って調製した同濃度のネライストキシン標準液に対するピーク面積比を確認した。その結果は Table 5 のとおりであり、ネライストキ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。

Table 5 Matrix effect study

Sample	Concentration of nereistoxin		Matrix effect ^{b)} (%)
	Matrix standard solution (ng/mL)	Sample (as cartap) ^{a)} (mg/kg)	
ECS	191	0.7	98.7

$n = 3$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of nereistoxin in the presence of matrix to that in the absence of matrix

3.5 添加回収試験

2.7に従ってECSを用いた添加回収試験を実施した。その結果は Table 6 のとおり、平均回収率 79.7~83.7%，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として、6.9%以下の成績が得られ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値（真度：70%以上120%以下，精度：0.02 mg/kg では22%以下，0.7 mg/kg では17%以下）を満たす良好な結果であった。

なお、得られたSIMクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Recovery (%)	RSD _r ^{c)} (%)
0.0175	79.7 ^{a)}	5.3
0.614	83.7 ^{b)}	6.9

a) The cartap was spiked to air-dried ECS samples just before extraction. The spiked levels were 0.02 and 0.7 mg/kg as air dry basis for cartap. The levels of cartap as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of ECS samples was 30 % as fed basis and 20 % as air dry basis.

The levels of pesticides as fed basis (moisture 30 %)

= the levels of pesticides as air dry basis (moisture 20 %) / 1.14

b) Mean ($n = 6$)

c) Mean ($n = 5$)

d) Relative standard deviation of repeatability

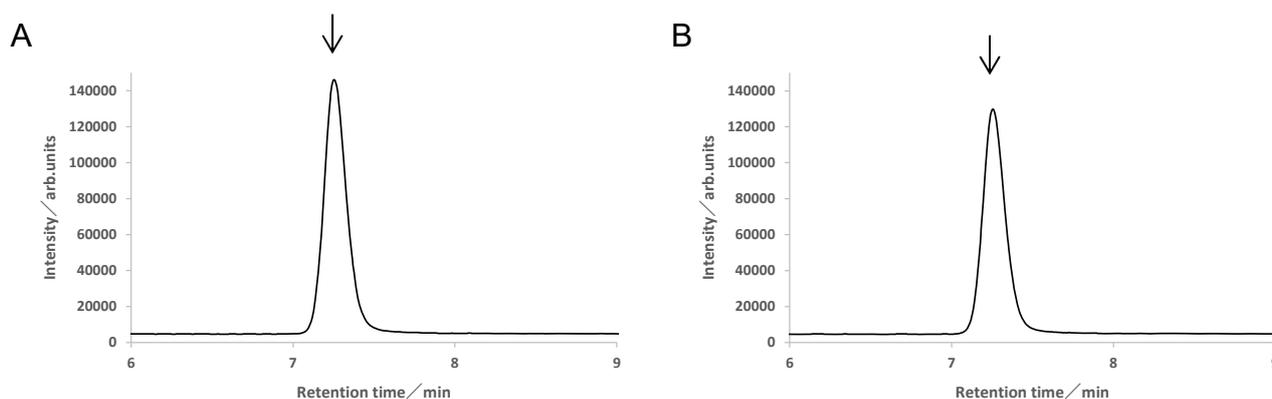


Fig. 3 Typical SIM chromatograms of nereistoxin in standard and spiked sample solution (LC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the peaks of nereistoxin.)

A: Standard solution (191 ng/mL of nereistoxin (382 pg as injection amount))

B: Sample solution of ECS (spiked at 0.614 mg/kg as fed basis of cartap)

3.6 定量下限及び検出下限の検討

検量線が直線性を示した範囲, 0.2~200 ng/mL の下端付近となる濃度 (ECS 風乾物中で 0.02 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中のネライストキシシ 5.5 ng/mL 相当量)) の添加回収試験の結果は Table 6 のとおり良好であり, 得られたピークの SN 比が 10 以上であったため, カルタップの定量下限の濃度は ECS の風乾物中で 0.02 mg/kg とした. ECS 中のカルタップに残留基準値は設定されていないが, 牧草中の残留基準値 (0.7 mg/kg) を参考基準値として評価したところ, 定量下限とした 0.02 mg/kg は参考基準値の 1/35 であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (基準値の 1/5 以下) を満たしていた.

また本法の検出下限は, 3.5 の添加回収試験により得られた定量値の標準偏差に Student の t -値を乗じた値の 2 倍とした. その結果, カルタップの検出下限の濃度は風乾物中で 0.003 mg/kg であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (基準値の 1/10 以下) を満たしていた.

4 まとめ

令和2年度の検討において、飼料分析基準収載法による分析で、妥当性確認済のとうもろこしについて真度の目標値に適合しなかったため、原因を調査したところ、以下の結果が得られた。また、カルタップの飼料分析基準収載法について ECS への適用の可否を検討したところ、キーパーの添加量を 0.03 mL 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) キーパーはネライストキシンの揮散を防ぐ効果があるものの、一定量以上を添加することで回収率が低下し、この原因としてイオン化阻害の可能性が示唆された。
- 2) とうもろこしにカルタップとして 0.2 mg/kg 相当量を添加し、キーパー添加量を 0.03 mL、0.1mL 及び 0.5 mL とする各条件において 6 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、キーパーを 0.03 mL 添加することにより回収率は改善され、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす結果が得られた。
- 3) 本検討で用いた ECS 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) 本法に従い得られた ECS 試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、カルタップ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。
- 5) ECS にカルタップとして原物換算して 0.0175 mg/kg 及び 0.614 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点以上の併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす結果が得られた。
- 6) 本法の ECS におけるカルタップの定量下限は風乾物中で 0.02 mg/kg、検出下限は風乾物中で 0.003 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

文 献

- 1) 食品安全委員会農薬専門調査会：カルタップ農薬評価書，令和元年6月(2016)。
- 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(2008)。
- 4) 関口 好浩，板橋 葵：カルタップの液体クロマトグラフ質量分析計による分析法の適用範囲をイアコンサイレンジに拡大するための妥当性確認，飼料研究報告，46，80-87(2021)。

精度管理**1 令和3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 2021)**

土井 雄悟^{*1}, 船水 悦子^{*2}, 渡辺 ちとせ^{*3},
小堀 拓也^{*4}, 福田 沙樹子^{*5}, 田島 麻帆^{*6}

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**

令和3年6月18日及び6月25日

3.2 調製場所

中部飼料株式会社知多工場及び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**

目開き1mmのスクリーンを装着した粉砕器で粉砕した中すう育成用配合飼料約100kgを用い, 以下の手順により試料を調製した。

試料をオーワキ式ミキサー(容量100kg)で900秒混合した後, 9等分し, 約11kgずつ袋に入れた。各袋より一定量(約20g)ずつとり, 別の袋に入れ, 1袋当たり約180g入りの試料340個を調製した。

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

^{*4} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

^{*5} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター, 現 表示監視部

^{*6} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター, 現 認定センター

2) B 試料

目開き 1 mm のふるいを通過させた魚粉約 100 kg を用い、A 試料と同様に試料 340 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 1 に示した 10 種類の原料を同表の混合割合で混ぜ合わせた試料（総量約 100 kg）を以下の手順により調製した。

原料のうち玄米、魚粉、りん酸カルシウム及び食塩についてリボンミキサー（容量 20 kg）で 180 秒混合した。その後すべての原料をオーワキ式ミキサー（容量 100 kg）で 900 秒混合した後、以下 A 試料と同様に試料 340 個を調製した。

表 1 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	30	なたね油かす	10
小麦	20	玄米	3
米ぬか油かす	10	魚粉	3
大豆油かす	10	りん酸カルシウム	2
ユーングルテンミール	10	食塩	2

4) D 試料

ほ乳期子豚育成用プレミックス約 100 kg を 9 等分し、約 11 kg ずつ袋に入れた。各袋より一定量（約 20 g）ずつとり、別の袋に入れ、1 袋当たり約 180 g 入りの試料 340 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、粗灰分及びカドミウム
- 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

「令和3年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」（125 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 protocol¹⁾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 2 に、また、その結果に基づく一元配置の分散分析結果を表 3 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 2 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	18.16	18.06	6.10	6.10	69.53	69.71	14.70	14.55	40.99	41.96	42.11	41.51
2	18.20	18.38	6.12	6.07	69.92	69.69	14.37	14.67	39.72	40.60	35.08	40.41
3	17.84	17.96	6.10	6.07	70.33	70.61	14.54	14.49	40.79	40.69	45.25	41.78
4	18.27	18.10	6.06	6.11	70.41	69.85	14.55	14.50	39.61	40.12	35.74	39.50
5	18.29	18.19	6.08	5.99	70.63	69.69	14.53	14.40	39.10	39.49	35.31	35.79
6	17.61	17.93	6.01	6.09	69.76	69.17	14.70	14.37	40.96	40.48	38.49	39.20
7	18.28	17.69	6.12	6.08	70.91	68.76	15.01	14.56	39.70	40.91	39.57	43.02
8	18.48	18.03	6.12	6.14	69.38	69.05	14.59	14.37	38.72	40.23	34.13	35.29
9	17.93	18.11	6.05	6.20	69.53	70.25	14.74	14.61	41.22	39.24	40.85	37.41
10	18.23	17.80	6.13	6.08	69.98	69.13	14.35	14.56	39.44	41.00	36.26	43.21

表 3 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	φ	$V=S/\varphi$	$F_0=V_A/V_E$	$F(\alpha=0.05)$
A試料	試料間 A	0.5215	9	0.0579	1.21	3.02
	粗たん白質分析誤差 E	0.4806	10	0.0481		
	総計 T	1.0021	19			
粗灰分	A	0.0159	9	0.0018	0.74	3.02
	E	0.0237	10	0.0024		
	T	0.0396	19			
B試料	A	2.4879	9	0.2764	0.72	3.02
	E	3.8328	10	0.3833		
	T	6.3207	19			
粗灰分	A	0.1999	9	0.0222	0.80	3.02
	E	0.2776	10	0.0278		
	T	0.4775	19			
D試料	A	7.2720	9	0.8080	1.30	3.02
	E	6.2126	10	0.6213		
	T	13.4847	19			
銅	A	135.8648	9	15.0961	2.34	3.02
	E	64.5411	10	6.4541		
	T	200.4060	19			

6 参加試験室

- 6.1 総数 215
うち 飼料検査指導機関…41
飼料製造業者関係…143
飼料添加物製造業者関係…13
民間分析機関等…18
- 6.2 試料別参加試験室数
A 試料…212
B 試料…206
C 試料…107
D 試料…83

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 4 に, ヒストグラムを図 1 に, また, 解析結果を表 5~7 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 8 及び 9 に示した.

の分析成績 (1)

B試料				D試料				試験 室番 号
水分 分析値 (%)	No. z-score	粗たん白質 分析値 (%)	No. z-score	粗灰分 分析値 (%)	No. z-score	カドミウム 分析値 (mg/kg)	No. z-score	
7.84	1 -0.48	71.64	3 <u>3.22</u>	14.74	1 1.26			1
7.82	1 -0.57	70.30	3 1.00	14.60	1 0.08			2
7.30	2 <u>-3.08</u>	68.90	4 -1.30	16.30	2 <u>14.41</u>		40.14 1 -0.34	3
8.03	1 0.43	69.89	3 0.33	14.66	1 0.59		40.75 1 0.00	4
7.81	1 -0.62	69.89	3 0.33	15.05	1 <u>3.87</u>		41.76 1 0.57	5
7.78	1 -0.77	68.74	2 -1.57	14.47	1 -1.01	0.49 2 -1.14	42.87 1 1.20	6
7.93	1 -0.04	70.12	3 0.71	14.65	1 0.50		43.52 1 1.58	7
8.13	1 0.91	69.86	3 0.28	14.44	1 -1.26			8
7.83	1 -0.52	68.47	2 -2.01	14.85	1 2.19		45.89 1 1.05	9
8.03	1 0.43	71.50	3 2.99	14.73	1 1.18		40.63 1 -0.06	10
8.03	1 0.43	69.88	3 0.31	14.27	1 -2.69			11
7.51	1 -2.07	68.76	2 -1.53	14.80	1 1.77			12
7.91	1 -0.14	72.20	3 <u>4.15</u>	14.63	1 0.33			14
7.71	1 -1.10	68.54	2 -1.90	14.46	1 -1.09			15
7.94	1 0.00	70.85	3 1.92	14.52	1 -0.59			16
7.88	1 -0.28	69.38	3 -0.51	14.45	1 -1.18		39.74 1 -0.57	18
7.66	1 -1.34	70.96	3 2.10	14.47	1 -1.01	0.47 2 -1.55	41.46 1 0.40	20
8.11	1 0.81	69.26	3 -0.71	14.72	1 1.09		39.18 1 -0.89	21
7.81	1 -0.62	70.76	3 1.77	14.50	1 -0.75		38.89 1 -1.55	22
7.77	1 -0.81	70.04	3 0.57	14.53	1 -0.50			23
7.94	1 0.00			14.19	1 <u>-3.37</u>	0.56 2 0.31	105.40 1 <u>36.87</u>	25
7.71	1 -1.10	70.19	3 0.82	14.69	1 0.84	0.70 1 <u>3.21</u>	37.13 1 -2.06	27
7.88	1 -0.28	70.53	3 1.39	14.70	1 0.92		43.24 1 0.06	28
7.99	1 0.24	70.07	3 0.62	14.53	1 -0.50		39.35 1 -0.79	29
7.89	1 -0.24	68.87	2 -1.35	14.68	1 0.75		41.75 1 -0.49	31
7.87	1 -0.33	69.15	1 -0.89	14.62	1 0.25			32
8.08	1 0.67	70.38	3 1.14	14.60	1 0.08		39.55 2 -0.68	33
7.99	1 0.24	69.63	3 -0.09	14.27	1 -2.69		39.01 2 -1.51	35
6.85	1 <u>-5.25</u>	70.25	3 0.92	14.57	1 -0.16			38
8.08	1 0.67	69.88	3 0.31	14.65	1 0.50			39
7.88	1 -0.28	70.30	3 1.00	14.68	1 0.75			41
7.84	1 -0.48	69.98	3 0.48	14.71	1 1.01			42
6.66	1 <u>-6.16</u>	68.36	1 -2.20	15.40	1 <u>6.82</u>			43
7.97	1 0.14	69.44	3 -0.41	14.56	1 -0.25		42.80 1 1.16	44
7.93	1 -0.04	68.78	3 -1.50	14.34	1 -2.10		47.28 1 1.57	45
8.40	2 2.21	69.89	3 0.33					46
7.84	1 -0.48	69.42	3 -0.44	14.59	1 0.00			48
7.94	1 0.00	69.76	3 0.11	14.58	1 -0.08			49
7.75	1 -0.91	69.58	3 -0.18	15.01	1 <u>3.54</u>		40.85 1 0.05	50
7.47	1 -2.26	67.38	2 <u>-3.82</u>	14.63	1 0.33		47.79 1 1.76	51
7.55	1 -1.87	68.39	4 -2.15	14.57	1 -0.16	0.74 2 <u>4.04</u>	39.59 1 -0.66	52
7.94	1 0.00	69.34	2 -0.57	14.60	1 0.08			53
7.57	1 -1.78	69.43	3 -0.43	14.60	1 0.08			54
7.55	1 -1.87	69.87	3 0.29	14.76	1 1.43			56
7.94	1 0.00	70.32	3 1.04	14.55	1 -0.33			57
8.01	1 0.33	69.62	3 -0.11	14.72	1 1.09			58
8.00	1 0.28	69.55	4 -0.23	14.41	1 -1.51			59
6.59	1 <u>-6.50</u>	69.26	2 -0.71	14.58	1 -0.08			61
7.64	1 -1.44			14.54	1 -0.42		39.48 1 -0.72	62
8.16	1 1.05	71.10	4 2.33	14.65	1 0.50		43.09 1 0.00	63
7.68	1 -1.25	70.41	3 1.19	14.55	1 -0.33			65
7.71	1 -1.10	68.35	4 -2.21	14.93	1 2.86			66
7.79	1 -0.72	69.87	3 0.29	14.93	1 2.86		42.31 1 0.88	68
8.38	2 2.11			14.76	1 1.43			70
7.93	1 -0.04	69.69	3 0.00	14.35	1 -2.02	0.49 1 -1.14	34.95 2 <u>-3.30</u>	71
8.16	1 1.05	69.78	3 0.14	14.55	1 -0.33		16.29 2 <u>-9.99</u>	72
7.76	1 -0.86	69.79	3 0.16	14.65	1 0.50		40.20 1 -0.31	73
8.01	1 0.33	69.49	2 -0.33	14.78	1 1.60	0.57 1 0.51	40.23 1 -0.29	74
7.67	1 -1.30	70.25	3 0.92	14.34	1 -2.10		43.61 1 0.20	75
7.55	1 -1.87	69.48	4 -0.34	14.60	1 0.08			77
		69.64	3 -0.08					77
8.13	1 0.91	69.72	4 0.04	14.51	1 -0.67	0.53 2 -0.31		78
7.86	1 -0.38	68.04	3 -2.73	14.39	1 -1.68		37.13 1 -2.06	79
8.17	1 1.10			14.67	1 0.67		38.12 1 -1.50	80
7.79	1 -0.72	69.63	1 -0.09				40.18 1 -1.07	81
8.20	1 1.25	69.96	3 0.44	14.71	1 1.01	0.60 2 1.14		82
8.02	1 0.38	69.43	4 -0.43	14.62	1 0.25	0.65 2 2.17	40.99 1 0.13	85
8.01	1 0.33	68.96	3 -1.20	14.55	1 -0.33			87
7.21	1 <u>-3.51</u>	68.93	3 -1.25					88
7.72	1 -1.05	75.62	4 <u>9.81</u>	15.83	1 <u>10.45</u>			89

表4 A, B 及び D 試料

試験番号	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
90	11.03	1 -0.88	17.92	2 -0.17	5.44	2 -2.82	4.20	3 0.62	6.37	1 0.14	1.314	2 1.30	0.739	1 -2.44				
91	11.36	1 0.08	18.16	3 0.87	5.63	2 -1.65	3.93	4 -0.12	6.38	1 0.21	1.470	1 <u>4.24</u>	0.788	1 0.70			50.5	3 -0.83
92	11.46	1 0.38	18.01	3 0.21	5.79	1 -0.67	4.16	2 0.51	6.21	1 -1.02	1.300	1 1.03	0.977	1 <u>12.84</u>			51.2	3 -0.48
93	11.40	1 0.20	17.86	3 -0.43	6.01	1 0.67			6.34	1 -0.07	1.245	2 0.00	0.736	1 -2.63	58.0	2 0.15		
94	11.38	1 0.14	17.63	3 -1.44	6.11	2 1.28	4.39	3 1.16	6.42	1 0.51	1.228	2 -0.32	0.776	1 -0.06			51.6	3 -0.27
95	11.03	1 -0.88	17.66	3 -1.31	5.90	1 0.00			6.01	1 -2.47								
96			21.41	1 <u>15.13</u>	4.79	1 <u>-6.80</u>	3.70	1 -0.76	6.44	1 0.65	1.328	1 1.56	0.787	1 0.64				
97	11.36	1 0.08	17.85	3 -0.48	5.79	2 -0.67			6.41	1 0.43								
100	11.23	1 -0.29	18.17	3 0.92	5.69	2 -1.28	3.68	3 -0.82	6.38	1 0.21	1.219	1 -0.49	0.781	1 0.25			52.8	3 0.33
101	11.64	1 0.91	17.51	3 -1.97	5.99	2 0.55	4.52	2 1.52	6.63	1 2.04								
102	11.46	1 0.38	17.82	3 -0.61	5.92	1 0.12	3.98	2 0.01	6.33	1 -0.14	1.254	1 0.16	0.761	1 -1.02				
103	11.25	1 -0.23	17.98	3 0.08	5.27	2 <u>-3.86</u>			6.48	1 0.94	1.280	2 0.66	0.780	1 0.19	54.9	2 -0.70		
104	10.47	1 -2.54	17.19	3 <u>-3.37</u>	6.25	1 2.14	3.80	2 -0.48	6.42	1 0.51	1.256	2 0.20	0.784	1 0.44			46.3	3 -2.97
106	11.34	1 0.02	17.87	3 -0.39	6.22	1 1.96	3.77	2 -0.57	6.30	1 -0.36	1.292	2 0.88	0.760	1 -1.09			57.9	3 2.92
107	11.68	1 1.03	18.08	3 0.52	5.87	2 -0.18			6.38	1 0.21					59.6	2 0.59		
109	11.48	1 0.44	18.16	3 0.87					6.34	1 -0.07							51.5	3 -0.33
110																		
111	10.96	1 -1.09	18.37	3 1.79	6.04	1 0.85	3.06	2 -2.55	6.42	1 0.51								
111			17.75	4 -0.92														
113	11.07	1 -0.77	18.03	3 0.30	6.10	1 1.22	3.91	1 -0.18	6.40	1 0.36	1.265	2 0.37	0.780	1 0.19				
114	11.10	1 -0.68													54.2	1 -0.90		
116	12.51	1 <u>3.49</u>	17.98	3 0.08	5.94	1 0.24	3.55	2 -1.18	6.27	1 -0.58								
117	11.21	1 -0.35	17.39	4 -2.50	5.77	1 -0.79	4.56	3 1.63	6.12	1 -1.67	1.207	2 -0.71	0.786	1 0.57				
118	11.87	1 1.60	17.72	2 -1.05	6.11	1 1.28			6.34	1 -0.07	1.230	2 -0.28	0.780	1 0.19				
122	11.59	1 0.77	18.07	4 0.48	5.86	1 -0.24			6.26	1 -0.65								
124	11.52	1 0.56	18.08	3 0.52	5.94	1 0.24	3.67	2 -0.85	6.38	1 0.21					57.7	1 0.06		
125																		
126	11.21	1 -0.35	17.71	3 -1.09	5.71	2 -1.16	3.88	4 -0.26	6.22	1 -0.94	1.244	2 -0.01	0.770	1 -0.44				
127	11.56	1 0.68	18.13	3 0.74	5.74	2 -0.98			6.16	1 -1.38	1.210	2 -0.66	0.780	1 0.19				
128	10.99	1 -1.00	17.82	4 -0.61	6.01	1 0.67	4.03	1 0.15	6.13	1 -1.60	1.135	1 -2.07	0.780	1 0.19				
129	11.53	1 0.59	17.70	4 -1.14	6.09	1 1.16	3.46	2 -1.43	6.31	1 -0.29	1.225	2 -0.37	0.791	1 0.89			52.1	3 -0.02
130	12.50	2 <u>3.46</u>	17.60	2 -1.57					6.22	2 -0.94								
131	10.91	1 -1.24	18.10	4 0.61	5.90	1 0.00	3.97	1 -0.01	6.21	1 -1.02	1.300	2 1.03	0.800	1 1.47				
136	11.25	1 -0.23	17.99	3 0.13	5.92	1 0.12	3.62	2 -0.99	6.40	1 0.36	1.200	2 -0.84	0.780	1 0.19				
137	11.38	1 0.14	17.83	3 -0.57	5.92	1 0.12	3.65	2 -0.90	6.36	1 0.07	1.249	1 0.07	0.781	1 0.25			52.9	3 0.38
138	11.56	1 0.68	17.95	2 -0.04	6.19	1 1.77	4.04	2 0.18	6.28	1 -0.51	1.270	1 0.47	0.740	1 -2.37				
139	11.22	1 -0.32	17.78	4 -0.78	7.29	1 <u>8.52</u>			6.79	1 <u>3.20</u>			0.755	1 -1.41			53.6	3 0.73
140	11.56	1 0.68	17.72	4 -1.05	5.81	1 -0.55			6.55	1 1.45								
141	11.64	1 0.91	18.00	3 0.17	5.92	1 0.12	3.95	1 -0.06	6.21	1 -1.02	1.185	1 -1.13	0.781	1 0.25				
143	11.57	1 0.71	18.09	3 0.57	6.33	2 2.63			6.43	1 0.58								
144	11.60	1 0.80	17.96	3 0.00	5.65	2 -1.53	4.36	3 1.07	6.37	1 0.14	1.328	2 1.56	0.750	1 -1.73				
145	11.59	1 0.77	19.63	4 <u>7.32</u>	6.31	2 2.51	4.34	3 1.02	7.03	1 <u>4.95</u>								
146	11.62	1 0.85	17.86	4 -0.43	5.99	1 0.55	4.69	2 1.99	6.25	1 -0.72	1.255	2 0.18	0.747	1 -1.92				
147	11.87	1 1.60	17.79	2 -0.74	5.91	1 0.06			5.70	1 <u>-4.73</u>								
149	10.72	1 -1.80	18.20	4 1.05	6.71	1 <u>4.96</u>			5.83	1 <u>-3.79</u>								
150																		
154	10.72	1 -1.80	17.91	4 -0.21	6.14	1 1.47	4.53	3 1.55	6.30	1 -0.36	1.265	2 0.37	0.810	1 2.11				
155	10.72	1 -1.80	17.65	1 -1.35	6.02	1 0.73	3.84	2 -0.37	6.37	1 0.14	1.230	2 -0.28	0.782	1 0.32				
157	11.55	1 0.65	18.03	4 0.30	5.91	1 0.06	4.03	2 0.15	6.32	1 -0.21	1.260	2 0.28	0.790	1 0.83				
158	11.58	1 0.74	17.79	3 -0.74	5.97	1 0.42			6.35	1 0.00	1.161	2 -1.58	0.753	1 -1.54			49.4	3 -1.39
161	11.48	1 0.44	17.86	3 -0.43	6.00	1 0.61												
162	11.50	1 0.50	17.97	3 0.04	5.99	2 0.55			6.40	1 0.36	1.514	2 <u>5.07</u>	0.760	1 -1.09			53.5	3 0.68
163	11.45	1 0.35	17.87	4 -0.39	5.87	2 -0.18	3.90	1 -0.20	6.17	1 -1.31	1.285	2 0.75	0.764	1 -0.83			49.4	3 -1.39
164	10.82	1 -1.51	17.96	4 0.00	6.12	2 1.34			6.37	1 0.14								
165	11.07	1 -0.77	17.98	3 0.08	5.92	1 0.12	3.74	2 -0.65	6.34	1 -0.07	1.273	2 0.52	0.766	1 -0.70			54.3	3 1.09
166	11.85	1 1.54	17.86	4 -0.43	6.13	1 1.41	4.07	3 0.26	6.00	1 -2.55	1.284	2 0.73	0.775	1 -0.12				
168	11.04	1 -0.85	17.90	3 -0.26	5.81	2 -0.55	4.65	3 1.88	6.37	1 0.14	1.256	2 0.20	0.766	1 -0.70			50.4	3 -0.89
172	11.43	1 0.29	18.43	3 2.06					6.36	1 0.07	1.254	2 0.16	0.780	1 0.19				
174	11.12	1 -0.62	17.69	1 -1.18	5.81	1 -0.55			6.32	1 -0.21			0.749	2 -1.79				
176	10.98	1 -1.03	17.98	2 0.08	5.97	1 0.42	3.91	2 -0.18	6.42	1 0.51	1.194	2 -0.96	0.781	1 0.25			52.1	4 -0.02
178	11.28	1 -0.14	18.24	3 1.22					6.19	1 -1.16								
180	11.05	1 -0.83	18.02	2 0.26	6.01	1 0.67												
182	11.73	1 1.18	17.71	4 -1.09	5.97	1 0.42	3.80	2 -0.48	6.30	1 -0.36	1.082	2 <u>-3.07</u>	0.775	1 -0.12				
184	11.02	1 -0.91	17.99	3 0.13	5.73	2 -1.04	3.87	2 -0.29	6.56	1 1.53	1.267	2 0.41	0.785	1 0.51			52.9	3 0.38
185	11.33	1 0.00	17.86	3 -0.43	6.00	1 0.61	3.44	2 -1.49	6.36	1 0.07	1.278	2 0.62	0.784	1 0.44				
186	11.07	1 -0.77	18.28	3 1.40	5.81	1 -0.55	3.63	2 -0.96	6.44	1 0.65	1.177	2 -1.28	0.780	1 0.19				
187	11.05	1 -0.83	18.10	3 0.61					6.67	1 2.33	1.414	3 <u>3.18</u>	0.848	2 <u>4.56</u>				
192	11.34	1 0.02			5.77	1 -0.79			6.44	1 0.65								
193	11.02	1 -0.91	18.18	3 0.96	6.08	2 1.10			6.19	1 -1.16			0.823	2 2.95				
194	11.10	1 -0.68	17.87	2 -0.39	5.84	1 -0.36	4.09	3 0.32	6.27	1 -0.58	1.245	2 0.00	0.771	1 -0.38				

の分析成績 (2)

B試料						D試料						試験 室番 号			
水分		粗たん白質		粗灰分		カドミウム		銅		亜鉛			クエン酸モランデル		
分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (mg/kg)	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		
7.18	1	-3.66	69.87	2	0.29	14.61	1	0.16						90	
7.86	1	-0.38	70.38	3	1.14	14.64	1	0.42				20.2	1	-0.49	91
7.86	1	-0.38	69.85	3	0.26	14.45	1	-1.18				20.7	1	0.12	92
7.91	1	-0.14	69.25	3	-0.72	14.69	1	0.84							93
7.95	1	0.04	69.67	3	-0.03	14.45	1	-1.18				20.6	1	0.00	94
7.76	1	-0.86	69.78	3	0.14	14.18	1	-3.45							95
															96
7.03	1	-4.38	70.01	3	0.52	14.66	1	0.59							97
7.99	1	0.24	69.93	3	0.39	14.60	1	0.08				19.3	1	-1.59	100
8.36	1	2.02	69.71	3	0.03	16.88	1	19.30							101
7.99	1	0.24	69.81	3	0.19	14.62	1	0.25							102
7.78	1	-0.77	70.51	3	1.35	14.58	1	-0.08							103
7.10	1	-4.04	67.23	3	-4.07	14.60	1	0.08	41.88	1	0.64	42.68	1	-0.14	104
7.99	1	0.24	68.95	3	-1.22	14.35	1	-2.02	38.34	1	-1.37	46.72	1	1.36	106
7.93	1	-0.04	69.59	3	-0.16	14.74	1	1.26							107
												22.5	1	2.33	109
7.03	1	-4.38				14.51	1	-0.67							110
7.83	1	-0.52	69.53	3	-0.26	14.57	1	-0.16							111
			68.95	4	-1.22										111
7.78	1	-0.77	70.20	3	0.84	14.63	1	0.33							113
7.64	1	-1.44							40.20	1	-0.31	41.90	1	-0.43	114
8.56	1	2.98	72.40	3	4.48	14.80	1	1.77				21.1	1	0.61	116
8.19	1	1.20	67.16	4	-4.18	14.55	1	-0.33							117
7.91	1	-0.14	70.33	2	1.05	14.51	1	-0.67	42.88	1	1.21	44.82	1	0.65	118
7.71	1	-1.10	69.43	4	-0.43	14.62	1	0.25							122
8.00	1	0.28	69.67	3	-0.03	14.53	1	-0.50							124
												21.6	1	1.22	125
7.97	1	0.14	69.59	3	-0.16	14.43	1	-1.34	39.02	1	-0.98	38.98	1	-1.52	126
7.72	1	-1.05	70.23	3	0.89	14.59	1	0.00	45.06	1	2.45	50.97	1	2.94	127
8.03	1	0.43	69.53	4	-0.26	14.55	1	-0.33							128
7.93	1	-0.04	69.26	4	-0.71	14.51	1	-0.67	40.89	1	0.07	39.85	1	-1.20	129
8.60	2	3.17	63.00	2	-11.07	14.29	2	-2.52							130
7.75	1	-0.91	69.00	4	-1.14	14.74	1	1.26							131
7.98	1	0.19	69.81	3	0.19	14.55	1	-0.33	0.52	2	-0.51	43.76	1	1.71	136
8.08	1	0.67	70.16	3	0.77	14.90	1	2.61				21.2	1	0.73	137
												20.7	1	0.12	137
8.00	1	0.28	68.86	4	-1.37	15.16	1	4.80							138
8.11	1	0.81	68.95	4	-1.22	14.69	1	0.84							139
8.06	1	0.57	70.06	3	0.61	14.68	1	0.75							140
8.32	1	1.83	69.30	3	-0.64	14.67	1	0.67							141
															143
7.34	1	-2.89	69.88	3	0.31	14.71	1	1.01	43.95	1	1.82				144
7.98	1	0.19	73.44	4	6.20	16.02	1	12.05							145
7.87	1	-0.33	69.21	4	-0.79	14.41	1	-1.51							146
8.17	1	1.10	69.25	2	-0.72	14.04	1	-4.63							147
8.19	1	1.20	68.57	4	-1.85	14.52	1	-0.59							149
7.91	1	-0.14	69.31	4	-0.62	14.47	1	-1.01							150
7.10	1	-4.04	69.83	4	0.23	14.53	1	-0.50							154
7.74	1	-0.96	68.72	1	-1.60	14.73	1	1.18	0.51	2	-0.72	41.41	1	0.37	155
8.09	1	0.72	69.35	4	-0.56	14.64	1	0.42	42.78	1	1.15	44.45	1	0.51	157
7.92	1	-0.09	69.71	3	0.03	14.54	1	-0.42							158
8.10	1	0.77	69.70	3	0.01										161
8.06	1	0.57	69.86	3	0.28	14.62	1	0.25							162
7.84	1	-0.48	69.69	4	0.00	14.63	1	0.33							163
7.73	1	-1.01	69.52	4	-0.28	14.52	1	-0.59							164
7.97	1	0.14	69.67	3	-0.03	14.67	1	0.67	0.53	2	-0.31	41.41	1	0.37	165
8.15	1	1.01	68.94	4	-1.24	14.66	1	0.59				42.64	1	-0.16	166
7.87	1	-0.33	69.81	3	0.19	14.52	1	-0.59				19.8	1	-0.98	168
7.95	1	0.04	70.18	3	0.81	14.43	1	-1.34				20.4	1	-0.24	172
7.74	1	-0.96	68.88	1	-1.34	14.78	1	1.60							174
7.83	1	-0.52	69.23	2	-0.76	14.78	1	1.60	0.52	2	-0.51	39.81	1	-0.53	176
												41.35	1	-0.64	176
7.81	1	-0.62	69.77	3	0.13	14.43	1	-1.34							178
7.79	1	-0.72	69.14	2	-0.91										180
8.21	1	1.30	67.80	4	-3.12	14.56	1	-0.25							182
7.64	1	-1.44	69.05	3	-1.05	14.60	1	0.08	40.71	1	-0.02	41.49	1	-0.58	184
8.02	1	0.38	70.09	3	0.66	14.61	1	0.16							185
7.89	1	-0.24	70.88	3	1.96	14.53	1	-0.50							186
8.02	1	0.38	69.96	3	0.44	14.76	1	1.43	0.54	2	-0.10	41.82	1	0.61	187
8.16	1	1.05				14.65	1	0.50							192
												20.7	1	0.12	193
7.92	1	-0.09	69.38	2	-0.51	14.58	1	-0.08							194

表4 A, B 及び D 試料

試験室番号	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
195	10.72	1 -1.80	18.18	3 0.96			3.34	1 -1.77	6.32	1 -0.21								
196	11.32	1 -0.02	17.00	3 <u>-4.21</u>	5.90	1 0.00			6.44	1 0.65	1.280	2 0.66	0.793	1 1.02	59.9	2 0.68		
199	11.63	1 0.88	17.97	2 0.04					6.49	1 1.02								
202	11.43	1 0.29	18.27	3 1.35	5.91	2 0.06			6.38	1 0.21					59.4	1 0.54		
205	11.12	1 -0.62	17.94	4 -0.08	5.97	1 0.42	3.48	2 -1.38	6.17	1 -1.31			0.787	1 0.64				
206	10.95	1 -1.12	17.48	4 -2.10	6.02	1 0.73												
207	11.07	1 -0.77	18.27	4 1.35	6.36	1 2.82			6.36	1 0.07			0.769	1 -0.51				
208	11.10	1 -0.68	17.50	3 -2.01	6.20	1 1.83			6.22	1 -0.94								
209	11.63	1 0.88	17.32	3 -2.80	5.88	2 -0.12	4.17	2 0.54	6.35	1 0.00	1.171	2 -1.39	0.761	1 -1.02				
211			18.15	2 0.83														
214	11.33	1 0.00	17.62	3 -1.49					6.38	1 0.21							53.1	3 0.48
216	11.55	1 0.65	17.92	3 -0.17	5.77	1 -0.79	4.33	2 0.99	6.36	1 0.07	1.216	2 -0.54	0.811	1 2.18	51.8	1 -1.57		
217	12.37	1 <u>3.08</u>	17.88	1 -0.35	5.26	1 <u>-3.92</u>			6.37	1 0.14								
219	11.74	1 1.21	17.69	3 -1.18	5.87	2 -0.18			6.16	1 -1.38	1.222	2 -0.43	0.777	1 0.00	58.7	1 0.34		
220	11.38	1 0.14	17.59	4 -1.62	6.09	2 1.16	4.97	2 2.78	6.23	1 -0.87	1.214	1 -0.58	0.750	1 -1.73				
221	11.74	1 1.21	18.04	3 0.35	5.92	2 0.12	3.78	3 -0.54	6.25	1 -0.72	1.273	2 0.52	0.746	1 -1.99			53.7	3 0.78
223	11.26	1 -0.20	17.85	2 -0.48					7.83	2 <u>10.79</u>								
225	11.48	1 0.44	17.82	3 -0.61	5.93	2 0.18			6.43	1 0.58								
229	11.82	1 1.45	18.49	3 2.32					6.40	1 0.36	1.220	2 -0.47	0.780	1 0.19				
231	11.35	1 0.05	18.27	3 1.35	5.78	1 -0.73	3.34	2 -1.77	5.98	1 -2.69								
232	11.34	1 0.02	17.81	3 -0.65	5.84	2 -0.36	3.98	2 0.01	6.34	1 -0.07	1.280	2 0.66	0.760	2 -1.09				
237	12.30	1 2.87	17.37	4 -2.58	5.93	1 0.18	4.73	1 2.11	6.13	1 -1.60			0.425	1 <u>22.61</u>				
238	11.17	1 -0.47	18.04	3 0.35					6.42	1 0.51	1.204	2 -0.77	0.809	1 2.05				
239			18.05	3 0.39														
240			17.95	3 -0.04	5.82	2 -0.49	3.95	3 -0.06										
242	11.03	1 -0.88	17.91	1 -0.21	6.11	1 1.28			6.36	1 0.07								
244	11.29	1 -0.11	18.09	3 0.57	5.93	1 0.18			6.28	1 -0.51								
245	11.52	1 0.56	17.96	3 0.00	5.88	1 -0.12	3.96	3 -0.04	6.31	1 -0.29	1.227	2 -0.33	0.776	1 -0.06			56.6	3 2.26
246	12.00	1 1.98	18.09	4 0.57	5.95	1 0.30	3.81	2 -0.46	6.43	1 0.58								
247	11.33	1 0.00	18.03	3 0.30	5.85	2 -0.30	3.62	2 -0.99	6.46	1 0.80	1.371	2 2.37	0.756	1 -1.34			53.7	3 0.78
249	10.94	1 -1.15	17.85	3 -0.48	5.79	2 -0.67	3.71	2 -0.74	6.18	1 -1.23	1.550	1 <u>5.75</u>	0.780	1 0.19			52.5	3 0.17
250	11.67	1 1.00	17.39	1 -2.50	6.29	1 2.39	3.93	2 -0.12	6.20	1 -1.09	1.233	2 -0.22	0.790	1 0.83				
253	11.50	1 0.50	18.24	3 1.22					6.18	1 -1.23								
254	11.54	1 0.62	18.63	3 2.93	5.60	2 -1.83			6.30	1 -0.36	1.282	1 0.69	0.777	1 0.00				
255	11.15	1 -0.53	18.26	3 1.31	5.78	2 -0.73	4.22	3 0.68	6.32	1 -0.21	1.233	2 -0.22	0.779	1 0.12				
256	10.98	2 -1.03	17.83	3 -0.57					6.23	2 -0.87								
257	11.02	1 -0.91													55.7	1 -0.48		
258	11.60	1 0.80	17.99	3 0.13	6.05	1 0.91	4.07	3 0.26	6.26	1 -0.65	1.257	2 0.22	0.759	1 -1.15				
259	11.53	1 0.59	17.70	4 -1.14					6.41	1 0.43							50.6	3 -0.78
260	11.45	1 0.35	17.61	4 -1.53	5.43	1 -2.88	3.39	3 -1.63	6.45	1 0.72	1.395	2 2.83	0.762	1 -0.96				
261	11.47	1 0.41	18.01	4 0.21	6.10	1 1.22	3.88	2 -0.26	6.34	1 -0.07	1.287	2 0.79	0.802	1 1.60			51.3	3 -0.43
262	11.64	1 0.91	17.87	3 -0.39	5.90	1 0.00			6.39	1 0.29								
263	11.54	1 0.62	18.00	3 0.17			3.74	4 -0.65	6.16	1 -1.38	1.180	2 -1.22	0.768	1 -0.57				
265	11.47	1 0.41	17.99	3 0.13	6.01	1 0.67	4.25	3 0.76	6.36	1 0.07	1.269	2 0.45	0.773	1 -0.25			53.8	3 0.83
266	11.32	1 -0.02	17.79	4 -0.74	5.77	2 -0.79	5.45	3 <u>4.12</u>	6.43	1 0.58	1.491	2 <u>4.64</u>	0.782	1 0.32				
267	11.33	1 0.00	17.44	2 -2.28	2.95	2 <u>-18.08</u>	3.64	3 -0.93	5.95	1 -2.91	1.172	1 -1.37	0.734	1 -2.76				
268	11.66	1 0.97	17.85	3 -0.48	5.55	1 -2.14	3.71	2 -0.74	6.17	1 -1.31								
270	11.39	1 0.17	17.90	3 -0.26	5.82	1 -0.49			6.40	1 0.36	1.264	2 0.35	0.735	1 -2.69				
273	11.31	1 -0.05	17.73	1 -1.00	5.86	1 -0.24	3.89	2 -0.23	6.34	1 -0.07	1.256	2 0.20	0.795	1 1.15				
274	11.18	1 -0.44	17.56	3 -1.75	6.04	1 0.85	4.29	2 0.88	6.31	1 -0.29	1.262	2 0.32	0.787	1 0.64	57.2	1 -0.06		
274																	50.5	3 -0.83
276	10.62	1 -2.10	17.56	4 -1.75	5.69	2 -1.28	3.03	3 -2.64	6.49	1 1.02	1.228	2 -0.32	0.767	1 -0.64			49.4	4 -1.39
278	11.34	1 0.02	18.23	3 1.18					6.26	1 -0.65	1.248	2 0.05	0.795	1 1.15				
282	11.32	1 -0.02	18.66	3 <u>3.07</u>	5.79	1 -0.67	4.92	3 2.64	7.06	1 <u>5.17</u>	1.329	2 1.58	0.749	1 -1.79				
283	10.59	1 -2.19													61.4	1 1.09		
285	11.28	1 -0.14	17.58	1 -1.66	5.88	1 -0.12	3.49	2 -1.35	6.36	1 0.07	1.198	2 -0.88	0.782	1 0.32				
287	11.19	1 -0.41	18.03	3 0.30	5.91	1 0.06	3.98	4 0.01	6.35	1 0.00	1.208	2 -0.69						
292	11.12	1 -0.62			5.84	1 -0.36	3.50	2 -1.32	6.59	1 1.75	1.300	2 1.03						
297																	53.0	3 0.43
298	11.26	1 -0.20	17.72	4 -1.05	5.79	1 -0.67	4.04	3 0.18	6.37	1 0.14	1.318	2 1.37	0.763	1 -0.89	54.5	1 -0.82		
299	11.51	1 0.53	17.77	3 -0.83					6.21	1 -1.02					59.8	1 0.65		
303	11.74	1 1.21	17.91	3 -0.21					6.39	1 0.29								
304	11.61	1 0.83	18.01	3 0.21	5.80	1 -0.61	4.07	3 0.26	6.35	1 0.00	1.120	2 -2.35	0.770	1 -0.44			54.5	3 1.19
305	11.58	1 0.74	17.84	3 -0.52	6.04	1 0.85	3.83	3 -0.40	6.16	1 -1.38	1.245	2 0.00	0.780	1 0.19				
310	11.26	1 -0.20	17.64	3 -1.40	5.92	1 0.12	4.32	1 0.96	6.37	1 0.14	1.195	2 -0.94	0.775	1 -0.12				
311	11.38	1 0.14	18.06	3 0.43	5.82	1 -0.49												
313	11.65	1 0.94	17.96	3 0.00	5.85	1 -0.30	4.21	3 0.65	6.38	1 0.21	1.290	1 0.84	0.800	1 1.47	51.2	1 -1.73		
314	10.97	1 -1.06							6.35	1 0.00	1.240	2 -0.09	0.796	1 1.22			50.9	3 -0.63
317	11.15	1 -0.53	18.08	3 0.52	5.89	1 -0.06	4.13	3 0.43	6.42	1 0.51	1.269	2 0.45	0.810	1 2.11	52.6	1 -1.34		

の分析成績 (3)

B試料				D試料				試験 室番 号						
水分		粗たん白質		粗灰分		カドミウム			銅		亜鉛		クエン酸モランデル	
分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (mg/kg)	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	
7.47	1 -2.26	70.43	3 1.22	14.78	1 1.60									195
8.11	1 0.81	67.99	3 -2.81	14.52	1 -0.59									196
7.85	1 -0.43	69.25	2 -0.72	14.64	1 0.42	0.55	2 0.10	41.59	1 0.47	44.99	1 0.71			199
7.91	1 -0.14	70.24	3 0.91	14.52	1 -0.59									202
8.00	1 0.28	69.64	4 -0.08	14.49	1 -0.84	0.49	1 -1.14							205
7.68	1 -1.25	68.68	4 -1.67											206
7.96	1 0.09	68.39	4 -2.15	14.53	1 -0.50	0.61	2 1.34							207
7.62	1 -1.54	68.76	3 -1.53	14.55	1 -0.33									208
8.17	1 1.10	70.08	3 0.64	14.42	1 -1.43			50.33	1 <u>5.46</u>	52.58	1 <u>3.54</u>			209
		68.89	2 -1.32											211
7.96	1 0.09	68.99	3 -1.15	14.64	1 0.42									214
7.99	1 0.24	69.99	3 0.49	14.56	1 -0.25									216
8.74	1 <u>3.85</u>	68.75	1 -1.55	14.43	1 -1.34									217
8.16	1 1.05	69.41	3 -0.46	14.37	1 -1.85									219
7.92	1 -0.09	68.95	4 -1.22	14.39	1 -1.68									220
8.12	1 0.86	69.55	3 -0.23	14.41	1 -1.51	0.56	2 0.31	43.81	1 1.74	45.43	1 0.88			221
6.21	1 <u>-8.33</u>	69.00	2 -1.14	14.09	2 <u>-4.21</u>									223
7.95	1 0.04	69.84	3 0.24	14.63	1 0.33									225
8.19	1 1.20	70.24	3 0.91	14.67	1 0.67									229
														231
7.79	1 -0.72	69.32	3 -0.61	14.59	1 0.00			40.60	1 -0.08	44.38	1 0.48			232
8.60	1 <u>3.17</u>	66.72	4 <u>-4.91</u>	14.41	1 -1.51									237
8.07	1 0.62	69.89	3 0.33	14.62	1 0.25									238
		69.96	3 0.44											239
		70.10	3 0.67											240
7.41	1 -2.55	69.26	1 -0.71	14.70	1 0.92									242
7.89	1 -0.24	70.23	3 0.89	14.70	1 0.92							19.9	1 -0.85	244
7.99	1 0.24	70.57	3 1.45	14.74	1 1.26			42.03	1 0.73	42.09	1 -0.36			245
8.68	1 <u>3.56</u>	69.20	4 -0.81	14.58	1 -0.08									246
7.92	1 -0.09	69.98	3 0.48	14.83	1 2.02							21.4	1 0.98	247
														249
7.96	1 0.09	69.65	3 -0.06	14.56	1 -0.25							18.9	1 -2.08	250
8.17	1 1.10	68.01	1 -2.78	14.41	1 -1.51									250
8.12	1 0.86	69.69	3 0.00	14.77	1 1.51									253
8.13	1 0.91	70.62	3 1.53	14.62	1 0.25									254
7.93	1 -0.04	69.66	3 -0.04	14.63	1 0.33	0.56	2 0.31							255
7.89	2 -0.24	70.11	3 0.69	14.56	2 -0.25									256
8.06	1 0.57							43.41	1 1.51	42.24	1 -0.30	20.5	1 -0.12	257
8.15	1 1.01	69.89	3 0.33	14.41	1 -1.51	0.57	1 0.51	38.86	1 -1.07	40.55	1 -0.94			258
7.85	1 -0.43	69.64	4 -0.08	14.56	1 -0.25							18.8	1 -2.20	259
8.11	1 0.81	67.84	4 <u>-3.06</u>	14.80	1 1.77	0.25	2 <u>-6.12</u>	44.49	1 2.13	51.07	1 2.98			260
8.03	1 0.43	70.05	4 0.59	14.53	1 -0.50			39.85	1 -0.51	44.50	1 0.53	20.3	1 -0.36	261
8.13	1 0.91	69.73	3 0.06	14.62	1 0.25									262
8.07	1 0.62	69.93	3 0.39	14.43	1 -1.34	0.56	2 0.31	41.47	1 0.41	43.05	1 0.00			263
8.18	1 1.15	69.24	3 -0.74	14.67	1 0.67	0.55	2 0.10	40.90	1 0.08	43.47	1 0.14	20.1	1 -0.61	265
7.95	1 0.04	68.00	4 -2.79	14.53	1 -0.50	0.46	2 -1.76	38.88	1 -1.06	39.92	1 -1.17			266
7.80	1 -0.67	69.58	2 -0.18	14.39	1 -1.68									267
8.03	1 0.43	69.62	3 -0.11	14.61	1 0.16									268
7.83	1 -0.52	69.68	3 -0.01	14.67	1 0.67			39.36	1 -0.79	42.61	1 -0.17			270
7.98	1 0.19	68.97	1 -1.19	14.46	1 -1.09	0.53	2 -0.31	40.61	1 -0.07	44.93	1 0.69			273
8.11	1 0.81	69.54	3 -0.24	14.48	1 -0.92	0.56	1 0.31	42.27	1 0.86	46.90	1 1.42	21.1	1 0.61	274
														274
7.54	1 -1.92	68.57	4 -1.85	14.76	1 1.43	0.62	2 1.55	96.78	2 <u>31.95</u>	91.72	2 <u>18.15</u>			274
8.01	1 0.33	69.93	3 0.39	14.56	1 -0.25									276
														278
7.74	1 -0.96							41.76	1 0.57	41.27	1 -0.67	19.8	1 -0.98	282
								40.83	1 0.04	39.05	1 -1.50			283
7.89	1 -0.24	70.05	3 0.59	14.55	1 -0.33			40.92	1 0.09	41.51	1 -0.58			285
8.14	1 0.96			14.79	1 1.68									287
														292
														297
8.03	1 0.43	69.31	4 -0.62	14.71	1 1.01	0.58	2 0.72	40.35	1 -0.22	41.39	1 -0.62	20.6	1 0.00	298
8.50	1 2.69	69.47	3 -0.36	14.81	1 1.85									299
8.11	1 0.81	70.47	3 1.29	14.42	1 -1.43									303
8.11	1 0.81	70.10	3 0.67	14.51	1 -0.67			40.75	1 0.00	40.24	1 -1.05	19.2	1 -1.71	304
8.01	1 0.33	69.73	3 0.06	14.61	1 0.16	0.53	2 -0.31	39.16	1 -0.90	42.07	1 -0.37	20.2	1 -0.49	305
8.06	1 0.57	69.63	3 -0.09	14.39	1 -1.68			39.97	1 -0.44	39.77	1 -1.23			310
8.12	1 0.86	70.06	3 0.61											311
8.02	1 0.38	70.03	3 0.56	14.58	1 -0.08									313
7.88	1 -0.28			14.80	1 1.77	0.48	2 -1.34	38.83	1 -1.09	46.54	1 1.29	20.1	1 -0.61	314
7.94	1 0.00	70.02	3 0.54	14.59	1 0.00					12.90	1 <u>-11.25</u>			317

表 4 A, B 及び D 試料

試験室番号	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
319	11.66	1 0.97	17.99	3 0.13	5.80	1 -0.61	4.17	1 0.54	6.14	1 -1.53	1.204	2 -0.77	0.774	1 -0.19				
321	10.97	2 -1.06	17.98	3 0.08					6.27	2 -0.58								
323	10.82	1 -1.51	16.44	4 <u>-6.66</u>					6.14	1 -1.53								
324	11.62	1 0.85	17.99	3 0.13	5.96	2 0.36	3.92	3 -0.15	6.33	1 -0.14	1.235	2 -0.18	0.749	1 -1.79	54.6	1 -0.79		
326	11.80	1 1.39	18.17	3 0.92					5.97	1 -2.77					59.3	1 0.51		
334	11.13	1 -0.59	17.99	3 0.13	5.81	2 -0.55	4.25	2 0.76	6.27	1 -0.58	1.386	2 2.66	0.771	1 -0.38				
335	11.62	1 0.85	17.76	3 -0.87					6.41	1 0.43	1.202	2 -0.81	0.759	1 -1.15			51.0	3 -0.58
338	10.90	2 -1.27	16.81	5 <u>-5.04</u>	5.71	3 -1.16	5.31	4 <u>3.73</u>	10.67	2 <u>31.50</u>								
338			16.98	4 <u>-4.29</u>	5.74	2 -0.98												
339	11.19	1 -0.41	18.35	1 1.71	5.95	1 0.30	3.88	2 -0.26	6.45	1 0.72	1.308	2 1.18	0.777	1 0.00				
339			18.23	3 1.18														

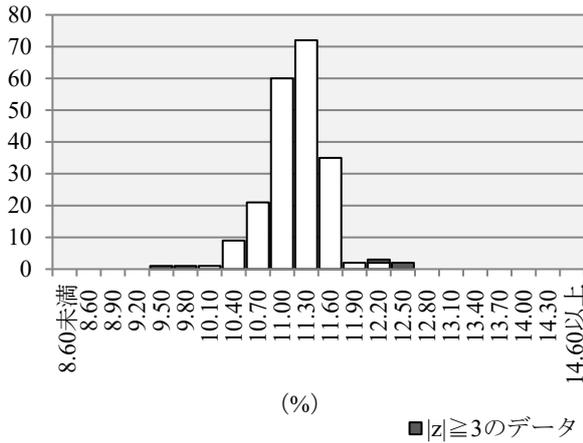
注1: z-scoreの欄に下線を付したものは、絶対値が3以上のものである。
 注2: 各試料のNo.欄は、分析法を示す。対応は以下のとおりである。

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						

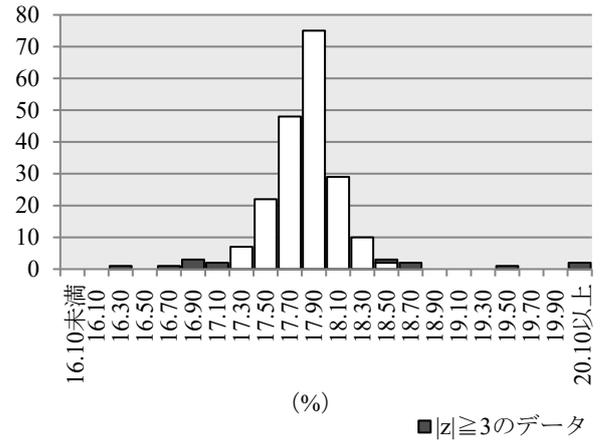
の分析成績 (4)

B試料						D試料						試験 室番 号							
水分		粗たん白質		粗灰分		カドミウム		銅		亜鉛			クエン酸モランデル						
分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (mg/kg)	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						
8.19	1	1.20	70.05	3	0.59	14.53	1	-0.50		40.39	1	-0.20	42.37	1	-0.26		319		
7.89	2	-0.24	70.08	3	0.64	14.59	2	0.00									321		
7.71	1	-1.10	62.53	4	<u>-11.85</u>	14.53	1	-0.50									323		
8.24	1	1.44	69.97	3	0.46	14.52	1	-0.59									324		
8.29	1	1.68	70.31	3	1.02	14.62	1	0.25									326		
7.94	1	0.00	69.94	3	0.41	14.51	1	-0.67									334		
8.22	1	1.34	70.18	3	0.81	14.48	1	-0.92		37.80	1	-1.68	41.54	1	-0.57	20.2	1	-0.49	335
7.03	2	<u>-4.38</u>	71.09	5	2.31	20.56	2	<u>50.33</u>									338		
			71.17	4	2.44												338		
7.95	1	0.04	68.29	1	-2.31	14.62	1	0.25	0.49	2	-1.14	40.27	1	-0.27	40.70	1	-0.88	339	
			70.63	3	1.55												339		

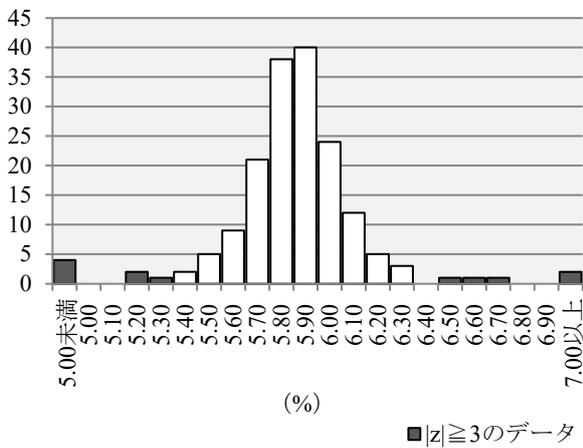
カドミウム	銅	亜鉛
No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法
1 溶媒抽出法	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準
2 簡易法	2 その他	2 その他
3 その他		



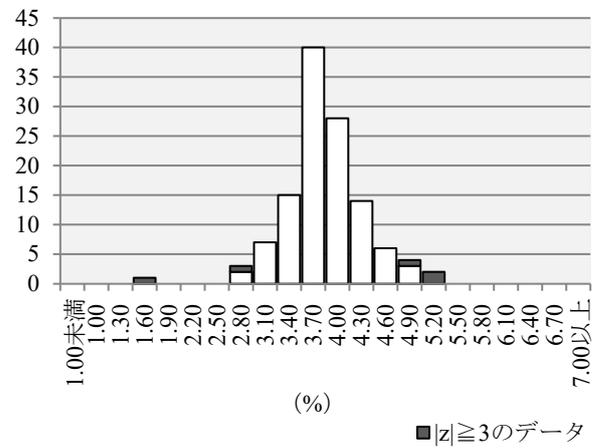
水分 (A 試料)



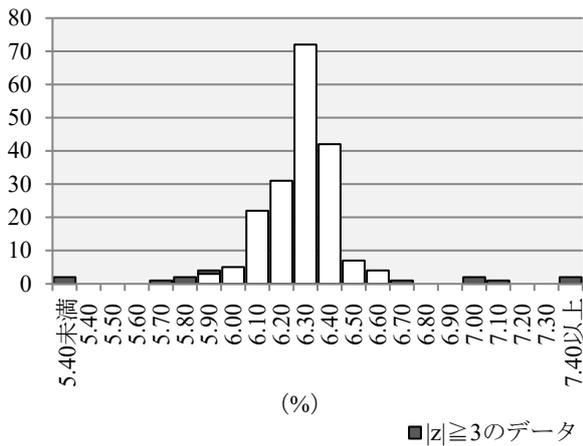
粗たん白質 (A 試料)



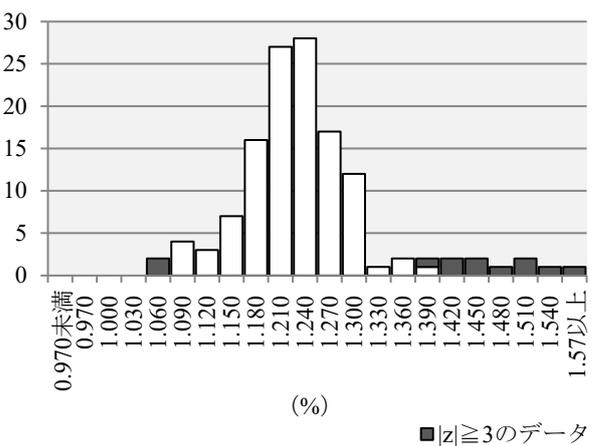
粗脂肪 (A 試料)



粗繊維 (A 試料)

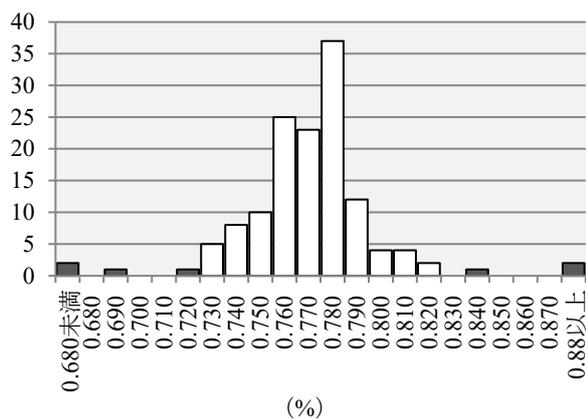


粗灰分 (A 試料)

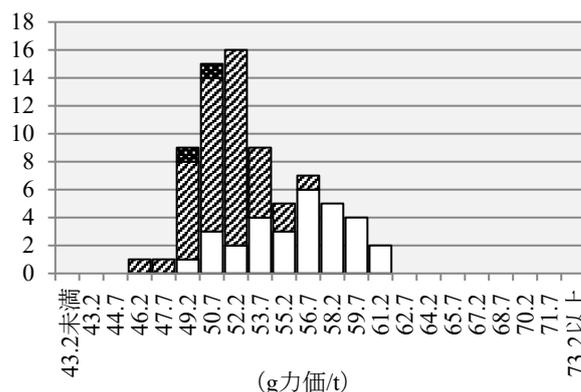


カルシウム (A 試料)

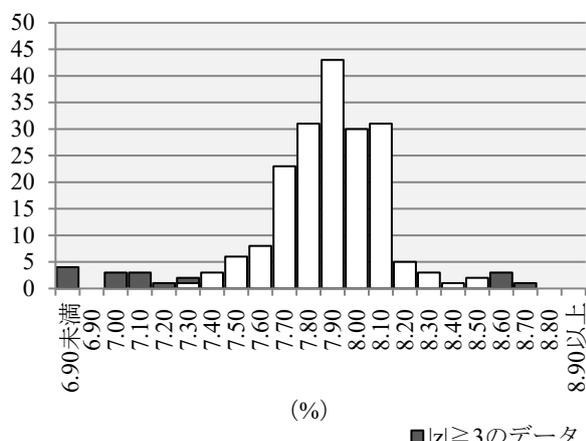
図1 分析成績のヒストグラム (1)



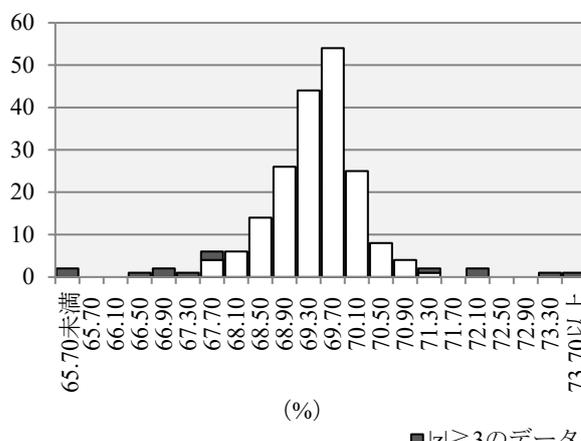
リン (A 試料)



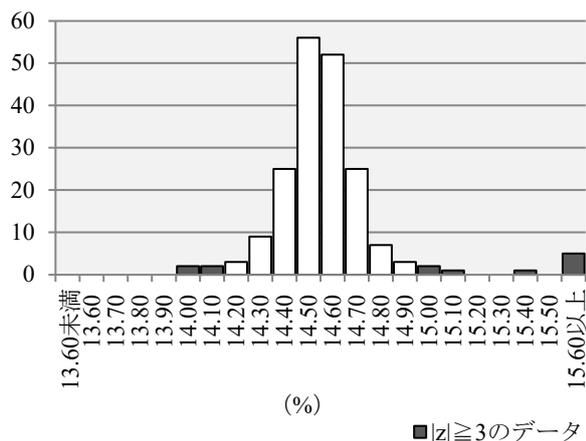
サルノマイシンナトリウム (A 試料)



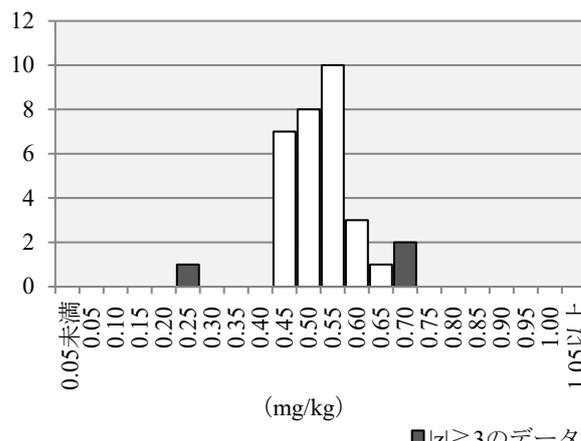
水分 (B 試料)



粗たん白質 (B 試料)

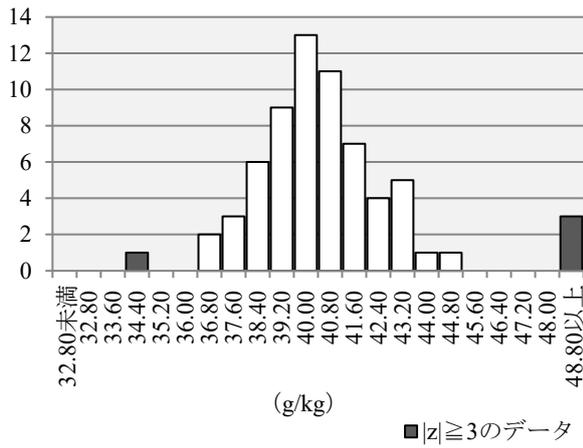


粗灰分 (B 試料)

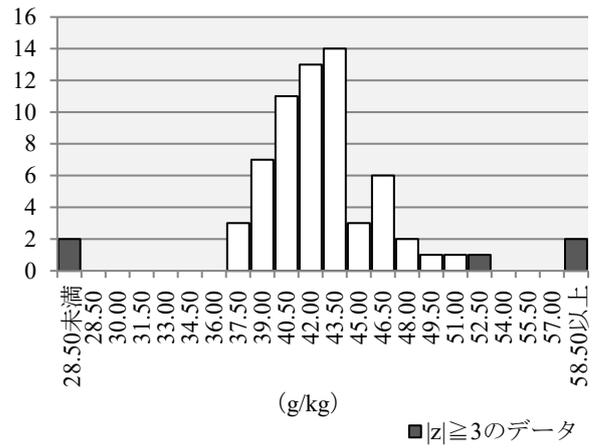


カドミウム (B 試料)

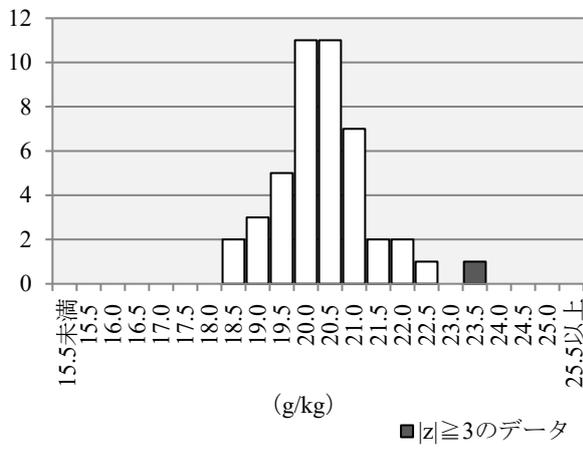
図1 分析成績のヒストグラム (2)



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5 A 試料の解析結果

区分 ^{注1}	水分 (%)	粗たん白質 (%)	粗脂肪 (%)	粗繊維 (%)	粗灰分 (%)
データ数	207	206	171	120	198
1 中央値	11.33	17.96	5.90	3.98	6.35
下限境界値 ^{注2}	10.32	17.28	5.41	2.90	5.94
上限境界値	12.34	18.64	6.39	5.05	6.76
平均値	11.31	17.94	5.90	3.99	6.33
2 標準偏差	0.33	0.24	0.17	0.40	0.13
変動係数 (%)	2.9	1.3	2.9	9.9	2.0
95%信頼区間	11.26~11.35	17.91~17.97	5.88~5.93	3.91~4.06	6.31~6.35

区分	カルシウム (%)	リン (%)	SL (管理分析法) ^{注3} (g(力価)/トン)	SL (飼料分析基準) ^{注4} (g(力価)/トン)
データ数	130	137	30	44
1 中央値	1.245	0.777	57.5	52.2
下限境界値 ^{注2}	1.086	0.730	46.7	46.3
上限境界値	1.404	0.824	68.2	58.0
平均値	1.240	0.775	56.7	52.2
2 標準偏差	0.055	0.018	3.3	2.1
変動係数 (%)	4.5	2.3	5.7	4.0
95%信頼区間	1.230~1.250	0.771~0.778	55.5~57.9	51.5~52.8

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6 B 試料の解析結果

区分 ^{注1}	水分 (%)	粗たん白質 (%)	粗灰分 (%)	カドミウム (mg/kg)
データ数	203	199	193	32
1 中央値	7.94	69.69	14.59	0.55
下限境界値 ^{注2}	7.32	67.88	14.23	0.40
上限境界値	8.56	71.50	14.95	0.69
平均値	7.94	69.64	14.59	0.54
2 標準偏差	0.20	0.64	0.13	0.05
変動係数 (%)	2.5	0.9	0.9	8.5
95%信頼区間	7.91~7.97	69.55~69.73	14.57~14.61	0.52~0.56

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7 D 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	銅	亜鉛	クエン酸モランテル
	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)
データ数	66	66	45
1 中央値	40.75	43.07	20.6
1 下限境界値 ^{注2}	35.49	35.03	18.2
1 上限境界値	46.01	51.11	23.0
2 平均値	40.82	43.30	20.5
2 標準偏差	1.75	2.90	0.8
2 変動係数 (%)	4.3	6.7	4.1
95%信頼区間	40.39~41.26	42.57~44.03	20.2~20.7

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 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	計		
		多量 ^{注1}	中量 ^{注2}				少量 ^{注3}
とうもろこし	30	103	4	0	107	0	100
小麦	20	15	51	17	83	24	78
米ぬか油かす	10	2	26	14	42	65	39
大豆油かす	10	37	57	7	101	6	94
コーングルテンミール	10	11	48	13	72	35	67
なたね油かす	10	4	87	16	107	0	100
玄米	3	5	44	20	69	38	64
魚粉	3	1	8	88	97	10	91
りん酸カルシウム	2	0	0	81	81	26	76
食塩	2	0	0	103	103	4	96

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9 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 ^{注1}	中量 ^{注2}	少量 ^{注3}	計
DDGS	7	27	4	38
精白米	4	24	9	37
ふすま	1	13	10	24
大麦	4	6	5	15
炭酸カルシウム	0	1	13	14
マイロ	2	2	6	10
ごま油かす	0	1	9	10
ビートパルプ	0	5	4	9
コーングルテンフィード	2	4	2	8
麦ぬか	0	2	3	5
肉骨粉	0	0	5	5
チキンミール	0	1	4	5
あまに油かす	0	2	2	4
えん麦	0	2	2	4
ライ麦	1	2	1	4
小麦粉	0	2	2	4
スクリーニングペレット	0	0	3	3
綿実油かす	0	0	2	2
アルファルファミール	0	1	1	2
キャッサバ	0	1	0	1
サフラワー油かす	0	1	0	1
やし油かす	0	0	1	1
パイナップルかす	0	0	1	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。

注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。

注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207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11.31%で、この95%信頼区間は11.26~11.35%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、200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11.31%、0.31%及び2.7%であった。

その他の方法では7件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは1件）の報告があった。

2) 粗たん白質

分析値は206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 17.94 %で、この 95 %信頼区間は 17.91~17.97 %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、12 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 17.82 %、0.34 %及び 1.9 %であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、22 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 17.88 %、0.22 %及び 1.2 %であった。

飼料分析基準・燃焼法では、131 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 17.99 %、0.22 %及び 1.2 %であった。

自動分析機による方法では、40 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 17.84 %、0.22 %及び 1.2 %であった。

その他の方法では 1 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があった。

3) 粗脂肪

分析値は 171 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 5.90 %で、この 95 %信頼区間は 5.88~5.93 %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、100 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 5.95 %、0.14 %及び 2.3 %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 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 5.85 %、0.18 %及び 3.0 %であった。

その他の方法では 2 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があった。

4) 粗繊維

分析値は 120 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 3.99 %で、この 95 %信頼区間は 3.91~4.06 %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、14 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 4.05 %、0.19 %及び 4.7 %であった。

飼料分析基準・ろ過法では、64 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 3.89 %、0.43 %及び 10.9 %であった。

自動分析機による方法では、34 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 4.17 %、0.34 %及び 8.1 %であった。

その他の方法では 8 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があった。

5) 粗灰分

分析値は 198 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 6.35 %で、この 95 %信頼区間は 6.31~6.35 %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、192 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 6.33 %、0.13 %及び 2.0 %であった。

その他の方法では 6 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があった。

6) カルシウム

分析値は 130 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 1.240 %で、この 95 %信頼区間は 1.230~1.250 %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、18 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 1.237 %、0.053 %及び 4.3 %であった。

飼料分析基準・原子吸光光度法では、111 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 8 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 1.241 %、0.056 %及び 4.5 %であった。

その他の方法では 1 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があった。

7) リン

分析値は 137 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 0.775 %で、この 95 %信頼区間は 0.771~0.778 %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、133 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 0.774 %、0.017 %及び 2.1 %であった。

その他の方法では 4 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 30 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 0 件であった。その平均値は 56.7 g(力価)/トンで、この 95 %信頼区間が 55.5~57.9 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 44 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 0 件であった。その平均値は 52.2 g(力価)/トンで、この 95 %信頼区間は 51.5~52.8 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、23 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 56.1 g(力価)/トン、3.4 g(力価)/トン及び 6.1 %であった。

管理分析法・フローインジェクション法では、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 59.1 g(力価)/トン、1.0 g(力価)/トン及び 1.6 %であった。

飼料分析基準・液体クロマトグラフ法では、42 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 52.4 g(力価)/トン、1.9 g(力価)/トン及び 3.7 %であった。

飼料分析基準・微生物学的定量法では、2 件の報告があり、報告数が少ないためロバスト法による解析はせず、参考値として平均値を算出した結果、50.8 g(力価)/トンであった。

8.2 B 試料（魚粉）の解析結果

1) 水分

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 16 件であった。これらを除いた平均値は 7.94 %で、この 95 %信頼区間は 7.91~7.97 %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、196 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 7.93 %、0.19 %及び 2.4 %であった。

その他の方法では 7 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があった。

2) 粗たん白質

分析値は 199 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 69.64 %で、この 95 %信頼区間は 69.55~69.73 %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、10 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 68.80 %、0.49 %及び 0.7 %であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、20 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 69.19 %、0.46 %及び 0.7 %であった。

飼料分析基準・燃焼法では、127 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 69.88 %、0.42 %及び 0.6 %であった。

自動分析機による方法では、41 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 69.13 %、0.80 %及び 1.2 %であった。

その他の方法では 1 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があった。

3) 粗灰分

分析値は 193 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 14.59 %で、この 95 %信頼区間は 14.57~14.61 %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、187 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 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 14.59 %、0.13 %及び 0.9 %であった。

その他の方法では 6 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があった。

4) カドミウム

分析値は 32 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 3 件であった。これらを除いた平均値は 0.54 mg/kg で、この 95 %信頼区間は 0.52~0.56 mg/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・溶媒抽出法では、6 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 0.56 mg/kg、0.08 mg/kg 及び 13.6 %であった。

飼料分析基準・簡易法では、26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0.54 mg/kg、0.04 mg/kg及び7.9%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66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4件であった。これらを除いた平均値は40.82 g/kgで、この95%信頼区間は40.39~41.26 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、63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40.84 g/kg、1.75 g/kg及び4.3%であった。

その他の方法では3件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは2件）の報告があった。

2) 亜鉛

分析値は66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43.30 g/kgで、この95%信頼区間は42.57~44.03 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、63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43.11 g/kg、2.53 g/kg及び5.9%であった。

その他の方法では3件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは2件）の報告があった。

3) クエン酸モランテル

分析値は45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1件であった。これらを除いた平均値は20.5 g/kgで、この95%信頼区間は20.2~20.7 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0.8 g/kg及び4.1%であった。

8.5 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。

107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23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30%）は、107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103件、中量が4件、少量が0件であった。

小麦（混合割合20%）は、83件（検出率78%）の報告があり、その内訳は多量が15件、中量が51件、少量が17件であった。

米ぬか油かす（混合割合10%）は、42件（検出率39%）の報告があり、その内訳は多量が2件、中量が26件、少量が14件であった。

大豆油かす（混合割合10%）は、101件（検出率94%）の報告があり、その内訳は多量が37件、中量が57件、少量が7件であった。

コーングルテンミール（混合割合10%）は、72件（検出率67%）の報告があり、その内訳は多量が11件、中量が48件、少量が13件であった。

なたね油かす（混合割合 10 %）は、107 件（検出率 100 %）の報告があり、その内訳は多量が 4 件、中量が 87 件、少量が 16 件であった。

玄米（混合割合 3 %）は、69 件（検出率 64 %）の報告があり、その内訳は多量が 5 件、中量が 44 件、少量が 20 件であった。

魚粉（混合割合 3 %）は、97 件（検出率 91 %）の報告があり、その内訳は多量が 1 件、中量が 8 件、少量が 88 件であった。

りん酸カルシウム（混合割合 2 %）は、81 件（検出率 76 %）の報告があり、その内訳は少量が 81 件であった。

食塩（混合割合 2 %）は、103 件（検出率 96 %）の報告があり、その内訳は少量が 103 件であった。

誤って検出された原料としては、DDGS が最も多く、38 件の報告があった。次いで、精白米が 37 件、ふすまが 24 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)

令和3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，粗灰分及びカドミウム
- 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

※ B試料のエトキシキン分析は，今年度は実施しません。

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）に定める方法並びに「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」（昭和63年5月11日付け63畜B第996号農林水産省畜産局長通知）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60年10月15日付け60畜B第2928号，農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知）の別記に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牛用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，必ず今年度の報告書様式（Microsoft Excel形式．入手方法は5（1）参照．）にて，報告してください。
- (3) 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。
- (4) 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、該当部分のみ記入した報告書を別途作成していただき、ご報告ください。

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、独立行政法人農林水産消費安全技術センターホームページ (http://www.famic.go.jp/ffis/feed/sub2_teawase.html) より「令和3年度飼料等の共通試料による分析鑑定結果報告書」をダウンロードしてMicrosoft Excel上で記入し、報告してください。

(2) 試料番号はA, B, C及びD試料でそれぞれ異なりますので、分析結果を報告する試料についてそれぞれ記入してください。(結果とりまとめ時はA試料の試料番号を試験室番号としますので、A試料の試料番号については分析を行わない場合も必ず記入してください。)

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、カドミウムについてはmg/kg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、備考欄に該当番号を記入し、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。

粗たん白質について、ガラス器具製の蒸留装置を用いて蒸留し、ビュレット等を用いて滴定した場合には「1. 飼料分析基準(ケルダール法(硫酸標準液吸収法))」または「2. 飼料分析基準(ケルダール法(ホウ酸溶液吸収法))」を選択してください。自動蒸留装置等で蒸留後、滴定した場合は「4. 自動分析機」を選択してください。

粗灰分について、灰化温度を記入してください。

なお、クエン酸モランテル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図(PDFファイル)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)から選択してください。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、該当する番号を選択してください。(複数回答される場合やその他を選択された場合、番号欄右枠に記入してください。)

(4) 分析の一部を別の試験室等で実施した場合は、実施した試験室名と分析項目を報告書の(5)

の欄もしくは報告時のメール本文に記載してください。

(5) 令和3年9月30日(木)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メールアドレスに送付してください。報告書のファイル名は試験室番号(A試料の番号) __試験室名としてください。(例: 試験室番号1番FAMIC本部の場合: 「1__FAMIC本部」)

複数の報告書を提出される場合は、ファイル名の末尾に全体数がかかるように番号を付けてください。(例: 計2つの報告書を提出する場合、1-2と2-2など)

報告メールの件名は「令和3年度手合わせ分析結果報告__試験室名」としてください。

メールの容量は添付ファイルを含めて必ず合計10MB以下にしてください。

提出済みの報告書に訂正等がある場合は件名に【再提出】と入れたメールもしくは電話で確実に担当者へご連絡ください。

正しく受信できた場合、10月1日までに受信確認メールを返信いたします。

提出した報告書ファイルは受信確認メールが届くまで破棄しないでください。

メールでの報告書提出が難しい場合は担当者までご連絡ください。

表省略

令和3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
 MAIL
 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	 %	分析法 	1 飼料分析基準 2 その他の方法
粗たん白質	 %	分析法 	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	 %	分析法 	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	 %	分析法 	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	 %	分析法 	1 飼料分析基準 灰化温度 °C 2 その他の方法
カルシウム	 %	分析法 	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	 %	分析法 	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(カ価)/トン	分析法 	1 迅速定量法 2 迅速定量法 (フローインジェクション装置使用) 3 飼料分析基準 (液体クロマトグラフ法) LC メーカー/型式 検出器 メーカー/型式 カラム メーカー/型式 内径(mm) 長さ(mm) 粒径(μm) 4 飼料分析基準 (微生物学的定量法)

(2) B試料 分析結果

試料番号

分析成分名	分析値	備考	
水分	%	分析法	1 飼料分析基準 2 その他の方法
粗たん白質	%	分析法	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
粗灰分	%	分析法	1 飼料分析基準 灰化温度 °C 2 その他の方法
カドミウム	g/t	分析法	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

(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	分析法	1 飼料分析基準 2 その他の方法
亜鉛	g/kg	分析法	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	分析法	1 飼料分析基準 測定条件 L C メーカー/型式 検出器 メーカー/型式 カラム メーカー/型式 内径(mm) 長さ(mm) 粒径(μm) 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	補足

-
- 混合割合
-
- 下から選択
 - 多量 (15%以上)
 - 中量 (5%以上15%未満)
 - 少量 (1%以上5%未満)
-
- 検出方法
-
- 下から番号を選択
 - その他の場合補足を記入
 - 1 肉眼
 - 2 酸処理
 - 3 アルカリ処理
 - 4 その他
-

注) 10種類の原料を混合しています。各セルの検出原料名のリストから選択してください。

検出原料名

下表から選択

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
米ぬか油かす	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	DDGS	肉骨粉	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	食塩	炭酸カルシウム	りん酸カルシウム

(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。(メール本文でも可)

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（令和3年度）****Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2021)**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**

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、農林水産省が毎年定めている「食品の安全性に関する有害化学物質のサーベイランス・モニタリング年次計画」等に基づき、法令等で定められている基準値等の適合状況のモニタリング及び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、令和3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**

令和3年4月から令和4年3月までの間に、農林水産省（地方農政局等）が飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律¹⁾（以下「飼料安全法」という。）第56条の規定に基づき、港湾サイロに対して立入検査を実施した際に収去した飼料、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並びにサーベイランスに協力いただいた飼料製造事業場において採取した飼料を対象とした。

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

飼料安全法第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²⁾（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。）が定められている。また、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準³⁾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。各試料に対するモニタリング等実施成分は、これらの基準値の他、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て以下のとおり選定した。

1) 有害物質

i かび毒 (24 成分)

ア 指導基準値等が定められているもの (4 成分)

とうもろこし又は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 B₁, ゼアラレノン, デオキシニバレノール及びフモニシン (B₁, B₂ 及び B₃ の総和, 以下同じ.) を対象とした.

イ ア以外のかび毒等 (20 成分)

飼料分析基準⁴⁾に方法が規定されている以下のかび毒 20 成分を対象とした.

かび毒: アフラトキシン B₂, G₁, G₂, ステリグマトシスチン, HT-2 トキシシン, T-2 トキシシン, 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, ジアセトキシシルペノール, デオキシニバレノール-3-グルコシド, オクラトキシシン A, シトリニン, α -ゼアララノール, β -ゼアララノール, ゼアララノン, α -ゼアラレノール及び β -ゼアラレノール

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, 水銀, 鉛及びヒ素を対象とした.

iii 農薬 (123 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 61 成分のうちの 34 成分を対象とした.

イ ア以外の農薬

飼料分析基準に方法が規定されている農薬のうちの 89 成分を対象とした.

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								
		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	動物由来たん白質					
顕微鏡 鑑定	ELISA 試験				PCR 試験	不溶性 不純物	サルモ ネラ			
種 類	試料 点数									
	幼すう育成用配合飼料	1			1					1
	大すう育成用配合飼料	3	3							
	成鶏飼育用配合飼料	26	26	7	7					5
	ブロイラー肥育前期用配合飼料	2	2		1					1
	ブロイラー肥育後期用配合飼料	5	4	1	2					
	肉用種鶏飼育用配合飼料	1	1							
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	4	3		1					1
	子豚育成用配合飼料	7	6	4	4					2
	肉豚肥育用配合飼料	11	10	3	2					2
	種豚育成用配合飼料	3	3							
	種豚飼育用配合飼料	6	5	1						1
配 混 合 飼 料	豚複数ステージ用	2	2		1					1
	ほ乳期子牛育成用配合飼料	2	2							
	若令牛育成用配合飼料	6	5		3	4	4	4		1
	乳用牛飼育用配合飼料	9	8	3	6	8	6	6		4
	幼令肉用牛育成用配合飼料	1			1	1	1	1		1
	肉用牛肥育用配合飼料	19	13	1	4	12	12	12		6
	肉牛繁殖用配合飼料	5	4	2	1	4	4	4		3
	種牛飼育用配合飼料	1	1	1		1	1	1		
	牛複数ステージ用	14	10	2	1	7	7	7		
	養殖水産動物用配合飼料	32		32						
	とうもろこし・ふすま二種混合飼料	1	1	1	1	1	1	1		1
	動物性たん白質混合飼料	3				3	3	3		2
糖蜜吸着飼料	1				1	1	1		1	
上記以外の混合飼料	22	1			22	22	22		2	
小 計	187	110	58	36	64	62	62		35	
穀 類	グレインソルガム（マイロ）	2	2		2					
	小麦粉	1	1							
	末粉	1	1							
	とうもろこし	45	45		45					
小 計	49	49		47						
そ う こ ろ 類	米ぬか	1	1							
	米ぬか油かす	8	8							1
	コーングルテンフィード	17	17							
	とうもろこしジスチラーズグレイン（DDG）	1	1							
	とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル（DDGS）	11	11							
	ビールかす	1	1							
	ふすま	7	7							
	ホミニーフィード	7	7							
小 計	59	59							1	

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							
		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	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				
種類	試料点数								
植物性油かす類	コーングルテンミール	13	13						
	コーンジャムミール	6	6						
	大豆油かす	16	14						2
	なたね油かす	10	10						
	小計	45	43						2
動物質性飼料	カニ殻粉末	1			1	1	1		1
	乾燥ホヤ殻	1			1	1	1		
	魚介類すり身	1			1	1	1		1
	魚粉	57		31	33	33	33		26
	原料混合肉骨粉	22		1		22	22		13
	酵素処理魚抽出物	2			2	2	2		1
	食品副産物（魚介類由来たん白質）	1			1	1	1		1
	チキンミール	14			14	14	14		12
	肉骨粉	2				2	2		2
	フェザーミール	9			9	9	9		3
小計	110		32	62	86	86		60	
乾牧草	アルファルファ	2		2					
	ウィートヘイ	1		1					
	オーツヘイ	3		3					
	ライグラス	1		1					
小計	7		7						
その他	コーンコブミール	2	2						
	動物性油脂	52							52
	小計	54	2						52
合計	511	263	97	90	126	148	148	52	98

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⁵⁾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⁶⁾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⁷⁾の試料採取方法に準拠した次の方法⁸⁾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

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。

i~iiiの試験方法の定量下限、検出下限及び回収率は飼料分析基準に記載されている。

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⁹⁾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 比重選別及び1.2 顕微鏡検査を応用した鑑定方法¹⁰⁾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

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。魚粉等、チキンミール等、肉骨粉等及び輸入飼料は、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。

3) 不溶性不純物

成分規格等省令別表第1の5の(1)のA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。

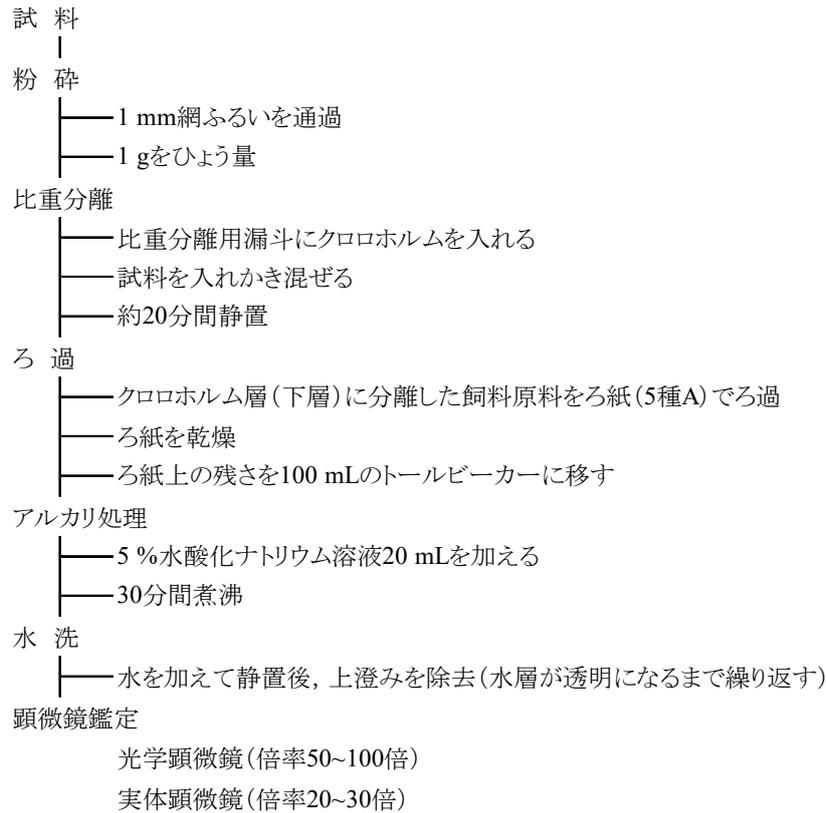


図 1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

3 結 果

3.1 有害物質

有害物質のモニタリング等の結果について、省令基準値及び指導基準値等の有無によりそれぞれ取りまとめた。

1) かび毒

配混合飼料 111 点、単体飼料 152 点について、指導基準値等が定められているアフラトキシン B₁、ゼアラレノン、デオキシニバレノール及びフモニシンの 4 成分のモニタリング及びサーベイランス、並びに指導基準値等が定められていないかび毒の 20 成分のサーベイランスを実施した。指導基準値等が定められている 4 成分の結果を表 2-1 に、指導基準値等が定められていない 20 成分の結果を表 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 B₁

配混合飼料 103 点中 5 点から検出され（検出率 5%）、最大値は 0.003 mg/kg、検出されたものの平均値（以下同様）は 0.001 mg/kg であり、指導基準値（乳用牛用 0.01 mg/kg）及び管理基準値（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 45 点中 4 点から検出され（検出率 9%）、最大値は 0.010 mg/kg、平均値は 0.0048 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。

ii ゼアラレノン

配混合飼料 103 点中 97 点から検出され（検出率 94 %），最大値は 0.17 mg/kg，平均値は 0.035 mg/kg であり，管理基準値（家畜及び家きんに給与される配合飼料で 0.5 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 45 点中 41 点から検出され（検出率 91 %），最大値は 0.14 mg/kg，平均値は 0.040 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，コーングルテンフィードの平均値は 0.30 mg/kg（最大値 0.74 mg/kg），DDGS の平均値は 0.20 mg/kg（最大値 0.33 mg/kg）及びコーングルテンミールの平均値は 0.52 mg/kg（最大値 2.5 mg/kg）であった。

iii デオキシニバレノール

配混合飼料 99 点中 90 点から検出され（検出率 91 %），最大値は 1.5 mg/kg，平均値は 0.32 mg/kg であり，管理基準値（反すう動物（ほ乳期のものを除く。）に給与される配合飼料は 3 mg/kg，家畜（反すう動物（ほ乳期のものを除く。）を除く。）及び家きんに給与される飼料は 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 45 点中 39 点から検出され（検出率 87 %），最大値は 1.2 mg/kg，平均値は 0.33 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，コーングルテンフィードの平均値は 4.0 mg/kg（最大値 5.8 mg/kg），DDGS の平均値は 2.2 mg/kg（最大値 3.0 mg/kg）及びコーングルテンミールの平均値は 0.27 mg/kg（最大値 0.73 mg/kg）であった。

iv フモニシン

配混合飼料 102 点全てから検出され，最大値は 1.6 mg/kg，平均値は 0.41 mg/kg であり，管理基準値（家畜及び家きんに給与される配合飼料は 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 35 点全てから検出され，最大値は 3.5 mg/kg，平均値は 0.75 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，コーングルテンフィードの平均値は 0.16 mg/kg（最大値 0.68 mg/kg），コーングルテンミールの平均値は 0.86 mg/kg（最大値 1.4 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及びサーベイランスの結果

モニタリング等の 対象試料	アフラトキシンB ₁ (検出下限 ²⁾ 0.0003 mg/kg)						ゼアラレノン (検出下限 ²⁾ 0.0003 mg/kg)					
	指導/管理 基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			管理 基準値 (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)	点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
(アフラトキシンB ₁ のみ) 配合飼料 (乳用牛用)	指 0.01	10	0	0								
配合飼料 (表外 ¹⁾ に示す飼料)	管 0.01	8	1	13	0.0006	0.0006	0.5	103	97	94	0.17	0.035
配合飼料 (上記以外の配合飼料)	管 0.02	85	4	5	0.0030	0.0012						
配合飼料小計		103	5	5	0.0030	0.0010		103	97	94	0.17	0.035
とうもろこし	管 0.02	45	4	9	0.010	0.0048	—	45	41	91	0.14	0.040
小麦粉	—	1	0	0			—	1	0	0		
米粉	—	1	0	0			—	1	0	0		
マイロ	—	2	0	0			—	2	1	50	0.021	0.021
米ぬか	—						—					
米ぬか油かす	—	8	0	0			—	8	8	100	0.012	0.0083
コーングルテンフィード	—						—	15	15	100	0.74	0.30
DDG	—						—					
DDGS	—	11	0	0			—	11	11	100	0.33	0.20
ビールかす	—						—					
ふすま	—	7	0	0			—	7	5	71	0.0070	0.0037
ホミニーフード	—						—					
麦ぬか	—						—					
コーングルテンミール	—						—	12	12	100	2.5	0.52
コーンジャムミール	—						—					
大豆油かす	—	11	0	0			—	11	10	91	0.0040	0.0025
なたね油かす	—						—					
コーンコブミール	—						—					
総 計		189	9	5				216	200	93		

1) 該当する配合飼料の種類は以下のとおり。

アフラトキシン B₁ : 幼すう用, ブ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 : 家畜及び家きん用

2) 複数の試験法がある成分については, 低い方の検出下限を記載した。

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及びサーベイランスの結果（続き）

モニタリング等の 対象試料	デオキシニバレノール（検出下限 ²⁾ 0.003 mg/kg)						フモニシン（B ₁ +B ₂ +B ₃ ）（検出下限 0.0006 mg/kg)					
	管理 基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			管理 基準値 (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)	点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
（アフラトキシンB ₁ のみ）												
配合飼料（乳用牛用）												
配合飼料 （表外 ¹⁾ に示す飼料）	3	38	38	100	1.5	0.43	4	102	102	100	1.6	0.41
配合飼料 （上記以外の配合飼料）	1	61	52	85	0.58	0.25						
配合飼料小計		99	90	91	1.5	0.32		102	102	100	1.6	0.41
とうもろこし	—	45	39	87	1.2	0.33	—	35	35	100	3.5	0.75
小麦粉	—	1	0	0			—					
米粉	—	1	0	0			—					
マイロ	—	3	1	33	0.099	0.099	—					
米ぬか	—	1	1	100	0.028	0.028	—					
米ぬか油かす	—	7	2	29	0.033	0.024	—					
コーングルテンフィード	—	13	13	100	5.8	4.0	—	17	16	94	0.68	0.16
DDG	—	1	1	100	4.1	4.1	—					
DDGS	—	7	7	100	3.0	2.2	—					
ビールかす	—	1	0	0			—					
ふすま	—	7	7	100	0.37	0.19	—					
ホミニーフード	—	7	6	86	1.6	1.2	—					
麦ぬか	—	6	6	100	0.080	0.043	—					
コーングルテンミール	—	7	6	86	0.73	0.27	—	13	13	100	1.4	0.86
コーンジャムミール	—	6	5	83	3.4	1.2	—					
大豆油かす	—	14	1	7	0.04	0.044	—					
なたね油かす	—	10	2	20	0.013	0.011	—					
コーンコブミール	—	2	0	0			—					
総 計		237	187	79				167	166	99		

1) 該当する配合飼料の種類は以下のとおり。

デオキシニバレノール：反すう動物（ほ乳期のものを除く。）用

フモニシン：家畜及び家きん用

2) 複数の試験法がある成分については、低い方の検出下限を記載した。

表 2-2 指導基準値等が定められていないかび毒のサーベイランスの結果

サーベイランスの対象成分	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 ₂	0.0003	189	2	1	0.0009	0.0007
アフラトキシンG ₁	0.0003	189	1	0.5	0.0060	0.0060
アフラトキシンG ₂	0.0003	189	1	1	0.0003	0.0003
ステリグマトシスチン	0.0003	186	47	25	0.0080	0.0011
HT-2トキシン	0.002	163	58	36	0.035	0.012
T-2トキシン	0.002	241	81	34	0.054	0.007
ネオソラニオール	0.002	241	3	1	0.004	0.003
フザレノン-X	0.003	241	2	0.8	0.045	0.034
3-アセチルデオキシニバレノール	0.006	163	10	6	0.94	0.12
15-アセチルデオキシニバレノール	0.006	163	90	55	2.0	0.20
ニバレノール	0.002	238	61	26	0.42	0.042
ジアセトキシシルペノール	0.002	163	4	2	0.003	0.003
デオキシニバレノール-3-グルコシド	0.002	163	127	78	0.47	0.10
オクラトキシンA	0.0003	166	34	20	0.073	0.0089
シトリニン	0.002	166	31	19	0.049	0.007
α -ゼアララノール	0.002	188	0	0		
β -ゼアララノール	0.002	188	0	0		
ゼアララノン	0.002	188	9	5	0.021	0.007
α -ゼアラレノール	0.003	188	5	3	0.012	0.007
β -ゼアラレノール	0.003	188	22	12	0.025	0.007

*複数の試験法がある成分については、低い方の検出下限を記載した。

2) 重金属等

配混合飼料（養殖水産動物用を除く）34点、乾牧草等8点、魚粉等（魚粉及び肉骨粉）7点及び養殖水産動物用配合飼料33点について、管理基準値が定められている重金属等4成分のモニタリング及びサーベイランスを実施した。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 カドミウム

養殖水産動物用を除く配混合飼料26点中8点から検出され（検出率31%）、最大値は0.26 mg/kg、平均値は0.11 mg/kgであり、管理基準値（0.8 mg/kg）を超えるものはなかった。

乾牧草等7点中1点から検出され（検出率14%）、その値は0.10 mg/kgであり、管理基準値（1 mg/kg）を超えていなかった。

動物質性飼料では、魚粉では31点全てから検出され、最大値は2.9 mg/kg、平均値は1.1 mg/kgであった。肉骨粉1点からは検出されなかった。いずれも、管理基準値（3 mg/kg）を超えるものはなかった。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では32点全点から検出され、最大値は0.97 mg/kg、平均値は0.58 mg/kgであった。

ii 水銀

養殖水産動物用を除く配混合飼料 26 点中 14 点から検出され（検出率 54 %），最大値は 0.05 mg/kg，平均値は 0.03 mg/kg であり，管理基準値（0.2 mg/kg）を超えるものはなかった。

乾牧草等 7 点中 6 点から検出され（検出率 86 %），最大値は 0.10 mg/kg，平均値は 0.04 mg/kg であり，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 31 点全てから検出され，最大値は 0.81 mg/kg，平均値は 0.19 mg/kg であった。肉骨粉 1 点からは検出されなかった。いずれも管理基準値（1 mg/kg）を超えるものはなかった。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では 32 点中 31 点から検出され（検出率 97 %），最大値は 0.28 mg/kg，平均値は 0.12 mg/kg であった。

iii 鉛

養殖水産動物用を除く配混合飼料 26 点中 3 点から検出され（検出率 12 %），最大値は 0.5 mg/kg，平均値は 0.4 mg/kg であり，管理基準値（2 mg/kg）を超えるものはなかった。

乾牧草等 7 点からは検出されなかった。

動物質性飼料では，魚粉 31 点中 15 点から検出され（検出率 48 %），最大値は 1.7 mg/kg，平均値は 0.7 mg/kg であった。肉骨粉 1 点からは検出されなかった。いずれも，管理基準値（7 mg/kg）を超えるものはなかった。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では 32 点中 13 点から検出され（検出率 41 %），最大値は 0.9 mg/kg，平均値は 0.4 mg/kg であった。

iv ひ素

養殖水産動物用を除く配混合飼料 26 点中 14 点から検出され（検出率 54 %），最大値は 0.83 mg/kg，平均値は 0.17 mg/kg であった。稲わらを除く乾牧草等 7 点中 1 点から検出され（検出率 14 %），値は 0.18 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。

動物質性飼料では，魚粉では 31 点全てから検出され，最大値は 7.9 mg/kg，平均値は 4.2 mg/kg であり，管理基準値（15 mg/kg）を超えるものはなかった。肉骨粉 1 点からは検出されなかった。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では 32 点全てから検出され，最大値は 4.0 mg/kg，平均値は 2.6 mg/kg であった。

表3 重金属等のモニタリング及びサーベイランスの結果

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)	
カドミウム	0.8	配混合飼料 (養殖水産動物用を除く)	26	8	31	0.26	0.11	0.03
	1	乾牧草等	7	1	14	0.10	0.10	
	3	魚粉	31	31	100	2.9	1.1	
		肉骨粉	1	0	0			
	—	養殖水産動物用配合飼料	32	32	100	0.97	0.58	
	総計	97	72	74	2.9	0.74		
水銀	0.2	配混合飼料 (養殖水産動物用を除く)	26	14	54	0.05	0.03	0.01
	0.4	乾牧草等	7	6	86	0.10	0.04	
	1	魚粉	31	31	100	0.81	0.19	
		肉骨粉	1	1	100	0.10		
	—	養殖水産動物用配合飼料	32	31	97	0.28	0.12	
	総計	97	83	86	0.81	0.12		
鉛	2	配混合飼料 (養殖水産動物用を除く)	26	3	12	0.5	0.4	0.2
	3	乾牧草等	7	0	0			
	7	魚粉	31	15	48	1.7	0.7	
		肉骨粉	1	0	0			
	—	養殖水産動物用配合飼料	32	13	41	0.9	0.4	
	総計	97	31	32	1.7	0.6		
ひ素	2	配混合飼料 (養殖水産動物用を除く)	26	14	54	0.83	0.17	0.05
		乾牧草等 (稲わらを除く)	7	1	14	0.18	0.18	
	15	魚粉	31	31	100	7.9	4.2	
	7	肉骨粉	1	0	0			
	—	養殖水産動物用配合飼料	32	32	100	4.0	2.6	
	総計	97	78	80	7.9	2.8		

3) 農薬

配混合飼料 36 点, 穀類 (とうもろこし及びマイロ) 47 点及び乾牧草等 7 点について, 省令基準値が定められている農薬 34 成分及び省令基準値が定められていない農薬 89 成分の計 123 成分についてモニタリング及びサーベイランスを実施した。省令基準値が定められている 34 成分の結果を表 4 に, 省令基準値が定められていない 89 成分の結果を表 5 に示した。

とうもろこし 1 点でシハロトリンの省令基準値を超過した。

その他に省令基準以内で検出されたものは, とうもろこしを中心に有機リン系農薬及びピレスロイド系農薬の検出が散見された他, グリホサートの検出率が高かった。結果の概要は以下のとおりであった。

i 有機リン系農薬

省令基準値が定められているクロルピリホス, クロルピリホスメチル, ピリミホスメチル, フェントロチオン及びマラチオンが主にとうもろこしから検出された。とうもろこしからの検出率は, ピリミホスメチル 18%, マラチオン 16% の順に高かった。

ii ピレスロイド系農薬

省令基準値が定められているシハロトリン，デルタメトリン及びトラロメトリン並びにペルメトリンが主にとうもろこしから検出された。シハロトリン 1 点は，省令基準値 0.04 mg/kg を超えるものであった。とうもろこしからの検出率はいずれも 3 から 5 %であった。

iii グリホサート

省令基準値が定められているとうもろこし及び牧草（計 10 点）についてモニタリングを実施した結果，とうもろこしは 7 点中 7 点から検出（検出率 100 %，最大値 0.08 mg/kg），牧草は 3 点中 1 点から検出（検出率 33 %，7.9 mg/kg）されたが、省令基準値を超えるものはなかった。

iv その他の検出された農薬

省令基準値が定められていない農薬については，プロパルギット，プロピコナゾール及びメトミノストロビンがいずれも牧草から検出された。

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（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	19	0	0			
	配混合飼料 (牛等用)	0.4	17	0	0			
	牧草	0.4	4	0	0			0.005
	基準値のない飼料	—	40	0	0			
	計	—	80	0	0			
BHC	配混合飼料	0.005	36	0	0			
	牧草	0.02	4	0	0			0.005
	基準値のない飼料	—	40	0	0			
	計	—	80	0	0			
DDT	配混合飼料	0.1	36	0	0			
	牧草	0.1	4	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	40	0	0			
	計	—	80	0	0			
アトラジン	とうもろこし	0.2	38	0	0			
	マイロ	0.02	2	0	0			
	牧草	15	4	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	36	0	0			
	計	—	80	0	0			
アラクロール	とうもろこし	0.02	38	0	0			
	マイロ	0.05	2	0	0			
	牧草	0.05	4	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	36	0	0			
	計	—	80	0	0			
アルドリン及び ディルドリン	配混合飼料	0.02	36	0	0			
	牧草	0.02	4	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	40	0	0			
	計	—	80	0	0			
イソフェンホス	とうもろこし	0.02	38	0	0			
	基準値のない飼料	—	42	0	0			0.02
	計	—	80	0	0			
エチオン	牧草	20	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	76	0	0			0.02
	計	—	80	0	0			
エンドリン	配混合飼料	0.01	36	0	0			
	牧草	0.01	4	0	0			0.01
	基準値のない飼料	—	40	0	0			
	計	—	80	0	0			
グリホサート	とうもろこし	1	7	7	100	0.08	0.04	0.01
	牧草	120	3	1	33	7.9	7.9	6
	計	—	10	8	80	0.08	0.06	
クロルピリホス	とうもろこし	0.1	38	2	5	0.05	0.04	
	マイロ	0.75	2	0	0			
	牧草	13	4	1	25	2.3	2.3	0.01
	基準値のない飼料	—	36	0	0			
	計	—	80	3	4	2.3	0.79	
クロルピリホスメチル	とうもろこし	7	38	2	5	0.05	0.04	
	マイロ	10	2	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	40	0	0			
	計	—	80	2	3	0.05	0.04	

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（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)	
クロルフェンビンホス	とうもろこし	0.05	38	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	42	0	0			
	計	—	80	0	0			
クロルプロファム	とうもろこし	0.05	38	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	42	0	0			
	計	—	80	0	0			
クロルベンジレート	とうもろこし	0.02	38	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	42	0	0			
	計	—	80	0	0			
シハロトリン	とうもろこし	0.04	38	2	5	0.07	0.05	0.02
	マイロ	0.2	2	0	0			
	牧草	0.6	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	1	3	0.29	0.29	
	計	—	80	3	4	0.29	0.13	
ジメトエート	とうもろこし	1	38	0	0			0.02
	マイロ	0.2	2	0	0			
	牧草	2	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	0	0			
	計	—	80	0	0			
ダイアジノン	とうもろこし	0.02	38	0	0			0.02
	マイロ	0.1	2	0	0			
	牧草	10	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	0	0			
	計	—	80	0	0			
デルタメトリン及びトラロメトリン	とうもろこし	1	38	2	5	0.10	0.07	0.03
	マイロ	1	2	0	0			0.03
	牧草	5	4	0	0			0.045
	基準値のない飼料	—	36	2	6	0.03	0.03	0.03
	計	—	80	4	5	0.10	0.05	
テルブホス	とうもろこし	0.01	38	0	0			0.005
	マイロ	0.05	2	0	0			
	牧草	1	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	0	0			
	計	—	80	0	0			
パラチオン	とうもろこし	0.3	38	0	0			0.02
	マイロ	0.08	2	0	0			
	牧草	5	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	0	0			
	計	—	80	0	0			
ピリミホスメチル	とうもろこし	1	38	7	18	1.1	0.24	0.02
	マイロ	1	2	1	50	0.33	0.33	
	基準値のない飼料	—	40	6	15	0.42	0.16	
	計	—	80	13	16	1.1	0.21	
フィプロニル	とうもろこし	0.02	38	0	0			0.003
	マイロ	0.01	2	0	0			
	基準値のない飼料	—	40	0	0			
	計	—	80	0	0			
フェニトロチオン	とうもろこし	1	38	1	3	0.08	0.08	0.02
	マイロ	1	2	0	0			
	牧草	10	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	2	6	0.04	0.04	
	計	—	80	3	4	0.08	0.05	

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（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)	
フェントエート	とうもろこし	0.4	38	0	0			0.02
	マイロ	0.4	2	0	0			
	基準値のない飼料	—	40	0	0			
	計	—	80	0	0			
フェンバレレート	配混合飼料（鶏・うずら用）	0.5	11	0	0			0.02
	配混合飼料（豚用）	4	8	0	0			
	配混合飼料（牛等用）	8	17	0	0			
	牧草	13	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	40	0	0			
計	—	80	0	0				
フェンプロパトリン	牧草	20	4	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	76	0	0			
	計	—	80	0	0			
ヘプタクロル	配混合飼料	0.02	36	0	0			0.02
	牧草	0.02	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	40	0	0			
	計	—	80	0	0			
ペルメトリン	とうもろこし	2	38	1	3	0.02	0.02	0.02
	マイロ	2	2	0	0			
	牧草	55	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	2	6	0.06	0.05	
	計	—	80	3	4	0.06	0.04	
ペンディメタリン	とうもろこし	0.2	38	0	0			0.02
	マイロ	0.1	2	0	0			
	牧草	15	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	0	0			
	計	—	80	0	0			
ホスメット	とうもろこし	0.05	38	0	0			0.02
	マイロ	0.05	2	0	0			
	牧草	40	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	0	0			
	計	—	80	0	0			
ホレート	とうもろこし	0.05	38	0	0			0.02
	マイロ	0.05	2	0	0			
	牧草	1.5	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	0	0			
	計	—	80	0	0			
マラチオン	とうもろこし	2	38	6	16	0.56	0.27	0.02
	マイロ	2	2	0	0			
	牧草	135	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	4	11	0.34	0.19	
	計	—	80	10	13	0.56	0.23	
メチダチオン	とうもろこし	0.1	38	0	0			0.02
	マイロ	0.2	2	0	0			
	牧草	12	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	0	0			
	計	—	80	0	0			

表5 農薬のサーベイランスの結果（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				検出下限 (mg/kg)	モニタリング等の対象成分	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)	モニタリング等の対象成分	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)
EPN	80	0	0	0	0.02	シラフルオフェン	80	0	0	0	0.02	フラムプロップメチル	80	0	0	0.02
アセトクロール	80	0	0	0	0.02	ターバシル	80	0	0	0	0.02	フルシトリネート	80	0	0	0.02
アミロホス	80	0	0	0	0.02	チオベンカルブ	80	0	0	0	0.02	フルトラニル	80	0	0	0.02
アマトリン	80	0	0	0	0.02	テクナゼン	80	0	0	0	0.02	フルトリアホール	80	0	0	0.02
アリドクロール	80	0	0	0	0.02	テトラクロルピホス	80	0	0	0	0.02	フルバリネート	80	0	0	0.02
アレスリン	80	0	0	0	0.02	テトラコナゾール	80	0	0	0	0.02	フルミオキサジン	80	0	0	0.02
イサゾホス	80	0	0	0	0.02	テトラジホス	80	0	0	0	0.02	フルミクロラックベンチル	80	0	0	0.02
イソプロチオラン	80	0	0	0	0.02	テブコナゾール	80	0	0	0	0.02	プロシミドン	80	0	0	0.02
イプロベンホス	80	0	0	0	0.02	テブエンピラド	80	0	0	0	0.02	プロクロール	80	0	0	0.02
エタルフルラリン	80	0	0	0	0.02	テフルトリン	80	0	0	0	0.02	プロバジン	80	0	0	0.02
エディフェンホス	80	0	0	0	0.02	テルブトリン	80	0	0	0	0.02	プロバニル	80	0	0	0.02
エトフェンプロックス	80	0	0	0	0.02	トリアジメホス	80	0	0	0	0.02	プロバルギット	80	1	0.09	0.09
エトフメセート	80	0	0	0	0.02	トリアレート	80	0	0	0	0.02	プロビコナゾール	80	2	15	7.7
エトプロホス	80	0	0	0	0.02	トリフルラリン	80	0	0	0	0.02	プロファム	80	0	0	0.02
エトリジアゾール	80	0	0	0	0.02	トリフロキシストロビン	80	0	0	0	0.02	プロフェノホス	80	0	0	0.02
エトリムホス	80	0	0	0	0.02	ナプロパミド	80	0	0	0	0.02	プロペタンホス	80	0	0	0.02
オキサジアゾン	80	0	0	0	0.02	パラチオンメチル	80	0	0	0	0.02	プロモブチド	80	0	0	0.02
カズサホス	80	0	0	0	0.02	ハルフェンプロックス	80	0	0	0	0.02	プロモプロピレート	80	0	0	0.02
カルフェントラジンエチル	80	0	0	0	0.02	ピフェントリン	80	0	0	0	0.02	プロモホス	80	0	0	0.02
キントゼン	80	0	0	0	0.02	ピベロホス	80	0	0	0	0.02	ヘキサコナゾール	80	0	0	0.02
クレンキシムメチル	80	0	0	0	0.02	ピリダフェンチオン	80	0	0	0	0.02	ベノキサコール	80	0	0	0.02
クロルタールジメチル	80	0	0	0	0.02	ピリダベン	80	0	0	0	0.02	ベンコナゾール	80	0	0	0.02
クロルデン	80	0	0	0	0.02	ピリプロキシフェン	80	0	0	0	0.02	ベンフルラリン	80	0	0	0.02
クロルフェナピル	80	0	0	0	0.02	ピングロゾリン	80	0	0	0	0.02	ホサロン	80	0	0	0.02
ジクロホップメチル	80	0	0	0	0.02	フェナリモル	80	0	0	0	0.02	ホスチアゼート	80	0	0	0.02
ジクロラン	80	0	0	0	0.02	フェノチオカルブ	80	0	0	0	0.02	メタクリホス	80	0	0	0.02
ジフェナミド	80	0	0	0	0.02	フェノトリン	80	0	0	0	0.02	メトキシクロル	80	0	0	0.02
ジフェノコナゾール	80	0	0	0	0.02	フェンチオン	80	0	0	0	0.02	メトミノストロビン	80	1	0.04	0.04
ジメチナミド	80	0	0	0	0.02	フェンプロナゾール	80	0	0	0	0.02	メトラクロール	80	0	0	0.02
ジメピペレート	80	0	0	0	0.02	ブタミホス	80	0	0	0	0.02					

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 33 点及びその他の魚介類由来たん白質 6 点、並びにチキンミール 14 点及びフェザーミール 9 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、PCR 試験においてチキンミール 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断した。肉骨粉（ポークミール）2 点及び原料混合肉骨粉 22 点について、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 試験において原料混合肉骨粉 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。これらの結果を表 7 及び表 8 に示した。

表 7 動物由来たん白質のモニタリングの結果（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			
	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	33	0	0	33	0	0	33	0	0	0
カニ殻粉末	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
乾燥ホヤ殻	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
魚介類すり身	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
酵素処理魚抽出物	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0
食品副産物（魚介類由来たん白質）	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
計	39	0	0	39	0	0	39	0	0	0

表 8 動物由来たん白質のモニタリングの結果（チキンミール, 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			
	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	14	0	0	14	0	0	14	1	7	0
フェザーミール	9	0	0	9	0	0	9	0	0	0
肉骨粉（ポークミール）				2	0	0	2	0	0	0
原料混合肉骨粉				22	1	5	22	0	0	0
計	23	0	0	47	1	2	47	1	2	0

国内で製造された若令牛育成用配合飼料 4 点、乳用牛飼育用配合飼料 8 点、幼令肉用牛育成用配合飼料 1 点、肉用牛肥育用配合飼料 12 点、種牛飼育用配合飼料 1 点、肉牛繁殖用配合飼料 4 点、牛複数ステージ用配合飼料 7 点、とうもろこし・ふすま二種混合飼料 1 点、糖蜜吸着飼料 1 点、その他の牛用混合飼料 8 点及びその他の畜種向けの混合飼料（動物質原料を含むもの）3 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。これらの結果を表 9 に示した。

輸入された牛用混合飼料 14 点について、顕微鏡鑑定、ELISA 試験及び PCR 試験による牛由来

たん白質の混入確認を実施した結果、いずれの飼料からも混入は認められなかった。これらの結果を表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			ほ乳動物由来DNA				反すう動物由来DNA		
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)		試験 点数	検出 点数	検出率 (%)
牛用飼料等													
若令牛育成用配合飼料	4	0	0	4	0	0	4	0	0				0
乳用牛飼育用配合飼料	8	0	0	6	0	0	6	0	0				0
幼令肉用牛育成用配合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
肉用牛肥育用配合飼料	12	0	0	12	0	0	12	0	0				0
種牛飼育用配合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
肉牛繁殖用配合飼料	4	0	0	4	0	0	4	0	0				0
牛複数ステージ用配合飼料	7	0	0	7	0	0	7	0	0				0
とうもろこし・ふすま二種混合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
糖蜜吸着飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
上記以外の混合飼料	8	0	0	8	0	0	8	0	0				0
小計	47	0	0	45	0	0	45	0	0	0	0	0	0
その他の畜種向け飼料 (動物質原料を含むもの)													
その他の混合飼料	3	0	0	3	0	0				3	0	0	0
小計	3	0	0	3	0	0				3	0	0	0
合計	50	0	0	48	0	0	45	0	0	3	0	0	0

表10 動物由来たん白質のモニタリングの結果（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						
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)				
牛用混合飼料													
アメリカ合衆国	6	0	0	6	0	0	6	0	0				0
フランス	3	0	0	3	0	0	3	0	0				0
英国	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
スイス	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
中華人民共和国	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
ブラジル	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
ブルガリア	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
合計	14	0	0	14	0	0	14	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）52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。その結果を表11に示した。

表11 不溶性不純物のモニタリングの結果

モニタリングの 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	52	0.11	0.022

3.4 サルモネラ

国内で製造された単体飼料 63 点及び配混合飼料 35 点についてモニタリングを実施した結果、単体飼料及び配混合飼料どちらでもサルモネラは検出されなかった。なお、単体飼料では、前年度の検出率は 0 %，前々年度の検出率は 1 %であった。また、配混合飼料では、前年度及び前々年度ともにサルモネラは検出されていない。これらの結果を表 12 及び表 13 に示した。

表 12 サルモネラのモニタリングの結果（単体飼料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試験点数	検出点数	検出率 (%)
動物質性飼料			
魚粉	26	0	0
チキンミール	12	0	0
フェザーミール	3	0	0
豚肉骨粉	2	0	0
原料混合肉骨粉	13	0	0
カニ殻粉末	1		
魚介類すり身	1		
酵素処理魚抽出物	1		
食品副産物（魚介類由来たん白質）	1	0	0
そうこう類			
米ぬか油かす	1	0	0
植物性油かす類			
大豆油かす	2	0	0
計	63	0	0

表 13 サルモネラのモニタリングの結果（配混合飼料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試験点数	検出点数	検出率 (%)
牛用配合飼料	15	0	0
鶏用配合飼料	7	0	0
豚用配合飼料	7	0	0
その他の混合飼料	6	0	0
計	35	0	0

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及び管理基準について，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・安全局畜水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).

調査資料**2 特定添加物検定結果等について（令和3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 2021)

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。

令和3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、令和3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、令和3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

令和3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3業者（前年度4業者）からあり、その製造形態等は、①製剤の製造のみを行っているのが1業者、②製剤の輸入のみを行っているのが2業者であり、国内製造の製造用原体は輸入品であった。

令和3年度に検定に合格した特定添加物は5種類、7銘柄（前年度6種類、8銘柄）であった。

製造用原体又は製剤の輸入先国は、①アビラマイシン（製剤）が英国、②ナラシン（製剤）が米国、③フラボフォスフォリポール（製剤）がブルガリア、④サリノマイシンナトリウム（製造用原体）が中国、⑤サリノマイシンナトリウム（製剤）がブルガリア、⑥エンラマイシン（製造用原体）が中国で、4カ国（前年度4カ国）であった。

表1 検定申請業者及び品名等一覧
(令和3年度)

管区※1	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)
本部	エランコジャパン株式会社※2	-	アビラマイシン	○	サーマックス200	200
			ナラシン	○	モンテパン100	100
	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
神戸	Huvepharma Japan株式会社※2	-	サリノマイシンナトリウム	○	サコックス100	100
			サリノマイシンナトリウム	○	サコックス200	200
			フラボフォスフォリポール	○	フラボマイシン80	80
計	3業者	1事業場	5種類		7銘柄	

※1 本部管区：関東・甲信越・静岡，神戸管区：近畿・中国（山口除く）・四国

※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

令和3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令和元年度及び令和2年度の結果とともに表2に示した。

令和3年度の検定合格件数は68件，合格数量は542トンで実量力価換算量は71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51.1%，64.3%，74.8%となり，件数，数量及び実量力価換算量ともに減少した。これは前述したとおり，申請業者数が減少したことが要因の一つと考えられる。

令和3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58.2%（前年度53.9%）で最も多く，次いでナラシン26.3%（前年度31.6%），アビラマイシン11.5%（前年度7.1%），フラボフォスフォリポール3.3%（前年度5.0%），エンラマイシン0.7%（前年度0.3%）となった。また，実量力価換算量については，令和3年度はサリノマイシンナトリウムが全体の59.8%（前年度51.8%）で最も多く，次いでナラシン20.1%（前年度28.1%），アビラマイシン17.7%（前年度12.6%），フラボフォスフォリポール2.0%（前年度3.5%），エンラマイシン0.4%（前年度実績0.2%）となった。

検定合格数量を類別にみると，令和3年度は，ポリエーテル系が84.4%（前年度87.6%），オルトソマイシン系が11.5%（前年度7.1%），ホスホグリコリピッド系が3.3%（前年度5.0%），ポリペプチド系が0.7%（前年度0.3%）であった。

令和3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，エンラマイシン及びアビラマイシンは増加したが，フラボフォスフォリポール，サリノマイシンナトリウム及びナラシンは減少し，前年度検定実績があったモネンシンナトリウムについては申請がなかった。

同様に類別に前年度と比較すると，検定合格数量及び実量力価換算量ともにポリペプチド系及びオルトソマイシン系は増加したものの，ホスホグリコリピッド系及びポリエーテル系は減少した。

亜鉛バシトラシンは平成28年度から，ノシヘプタイドは令和元年度から，ラサロシドナトリウムは平成22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，ビコザマイシンは平成11年度から検定の申請がなく，これらは令和3年度も申請がなかった。なお，ノシヘプタイド，モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムは，後述の表4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)
(令和元年度～令和3年度)

類別	特定添加物の種類	令和元年度			令和2年度			令和3年度		
		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)	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価換算量 (kg/力価)
ポリバブチド系	亜鉛バシトラシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	エンラマイシン	—	—	—	2	2,780	0.3	—	3,720	0.7
	ノシヘブタイド	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ホスホグリコリピッド系	計	0	0	0.0	2	2,780	0.3	222	3,720	0.7
	フラボフオスフオリポール	8	29,250	4.7	5	41,900	5.0	3,352	18,000	3.3
	小	8	29,250	4.7	5	41,900	5.0	3,352	18,000	3.3
	カリノマイシンナトリウム	64	274,626	44.1	79	454,195	53.9	49,017	315,220	58.2
ポリエーテル系	センデユラマイシンナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ナラシン	21	191,000	30.7	29	266,050	31.6	26,605	142,300	26.3
	モネンナトリウム	5	39,960	6.4	2	18,000	2.1	3,600	—	—
	ラサロシドナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—
オルトソマイシン系	小	90	505,586	81.2	110	738,245	87.6	79,222	457,520	84.4
	アピラマイシン	24	88,175	14.2	16	59,425	7.1	11,885	62,550	11.5
	計	24	88,175	14.2	16	59,425	7.1	11,885	62,550	11.5
その他	ピコザマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	小	0	0	0.0	0	0	0.0	0	0	0.0
総計	計	122	623,011	100.0	133	842,350	100.0	94,681	541,790	100.0
対前年度比 (%)	計	96.8	105.7	108.3	109.0	135.2	127.0	127.0	64.3	74.8

—: 実績なし

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。

令和3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。

精製級の実績はなく、すべて飼料級のみであった。

ノシヘプタイド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、令和3年度は、ノシヘプタイドは精製級と飼料級のどちらも検定の実績がなく、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）
（令和3年度）

類 別	特 定 添 加 物 の 種 類	精 製 級 [※]			飼 料 級 [※]		
		合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価換算量 (kg(力価))	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価換算量 (kg(力価))
ポリペプチド系	亜鉛バシトラシン	/	/	/	—	—	—
	エンラマイシン	/	/	/	3	3,720	298
	ノシヘプタイド	—	—	—	—	—	—
ホスホグリコリピッド系	フラボフォスフォリボール	/	/	/	2	18,000	1,440
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	—	—	—	33	315,220	42,322
	センデュラマイシンナトリウム	/	/	/	/	/	/
	ナラシン	/	/	/	13	142,300	14,230
	モネンシンナトリウム	—	—	—	/	/	/
	ラサロシドナトリウム	—	—	—	/	/	/
オルトソマイシン系	アピラマイシン	/	/	/	17	62,550	12,510
その他	ビコザマイシン	—	—	—	/	/	/
合 計		0	0	0	68	541,790	70,800
割 合 (%)		0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0

—：実績なし

※ 斜線は、当該区分の規格がないことを示す。

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

令和3年度初めの時点で、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及びラサロシドナトリウム、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。なお、平成29年度から令和3年度においてコーキン化学株式会社九州工場第三工場による製造実績はなく、令和3年4月16日付けで登録が廃止された。

令和3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、ノシヘプタイド、モネンシンナトリウム及び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。

令和3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847トン（対前年度比104.3%）、実量力価換算量は123トン(力価)（対前年度比102.6%）であった。

令和3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，ラサロシドナトリウム，サリノマイシンナトリウム，エンラマイシン，ノシヘプタイトの順に多かった。

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
(令和2・3年度)

類別	特定添加物の種類	令和2年度		令和3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	44,920	3,594	83,560	6,685
	ノシヘプタイト	80,940	3,238	84,720	3,389
	小計	125,860	6,831	168,280	10,074
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	146,380	14,638	153,580	15,358
	モネンシンナトリウム	351,520	70,304	379,760	75,952
	ラサロシドナトリウム	188,840	28,326	145,860	21,879
	小計	686,740	113,268	679,200	113,189
総計		812,600	120,099	847,480	123,263
対前年度比 (%)		89.5	95.4	104.3	102.6

※ 各登録特定飼料等製造業者より聞き取り

5 特定添加物の総数量等

令和3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。

令和3年度に製造及び輸入された特定添加物は8種類あり、総数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム（33.7%）、モネンシンナトリウム（27.3%）、ラサロシドナトリウム（10.5%）の順に多く、類別ではポリエーテル系が最も多く、1,137トン（検定：458トン、登録：679トン）と全体の81.8%を占めた。また、実量力価換算量を種類別にみると、モネンシンナトリウム（39.1%）、サリノマイシンナトリウム（29.7%）、ラサロシドナトリウム（11.3%）の順に多く、類別でもポリエーテル系が最も多く、170トン(力価)（検定：57トン(力価)、登録：113トン(力価)）と全体の87.5%を占めた。

次に、平成24年度から令和3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1及び図2に示した。

総数量は増減があるものの、減少傾向で推移した。また、その実量力価換算量はおおよそ変わらず推移した。

検定合格数量については増減があるものの、減少傾向で推移した。また、実量力価換算量も同様に減少傾向で推移した。

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、その製造数量は年々増加し、平成29年度から令和元年度までの3年間及び令和3年度は検定合格数量を上回った。令和3年度は、特定添加物の総数量全体の61.0%（前年度49.1%）、実量力価換算量全体の63.5%（前年度55.9%）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
（令和3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	亜鉛バシトラシン	—	—	—	—
	エンラマイシン	87,280	6.3	6,982	3.6
	ノシヘブタイド	84,720	6.1	3,389	1.7
	小計	172,000	12.4	10,371	5.3
ホスホグリコリピッド系	フラボフォスフォリボール	18,000	1.3	1,440	0.7
	小計	18,000	1.3	1,440	0.7
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	468,800	33.7	57,680	29.7
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—
	ナラシン	142,300	10.2	14,230	7.3
	モネンシンナトリウム	379,760	27.3	75,952	39.1
	ラサロシドナトリウム	145,860	10.5	21,879	11.3
	小計	1,136,720	81.8	169,741	87.5
オルトソマイシン系	アビラマイシン	62,550	4.5	12,510	6.4
	小計	62,550	4.5	12,510	6.4
その他	ビコザマイシン	—	—	—	—
	小計	0	0.0	0	0.0
総計		1,389,270	100.0	194,062	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

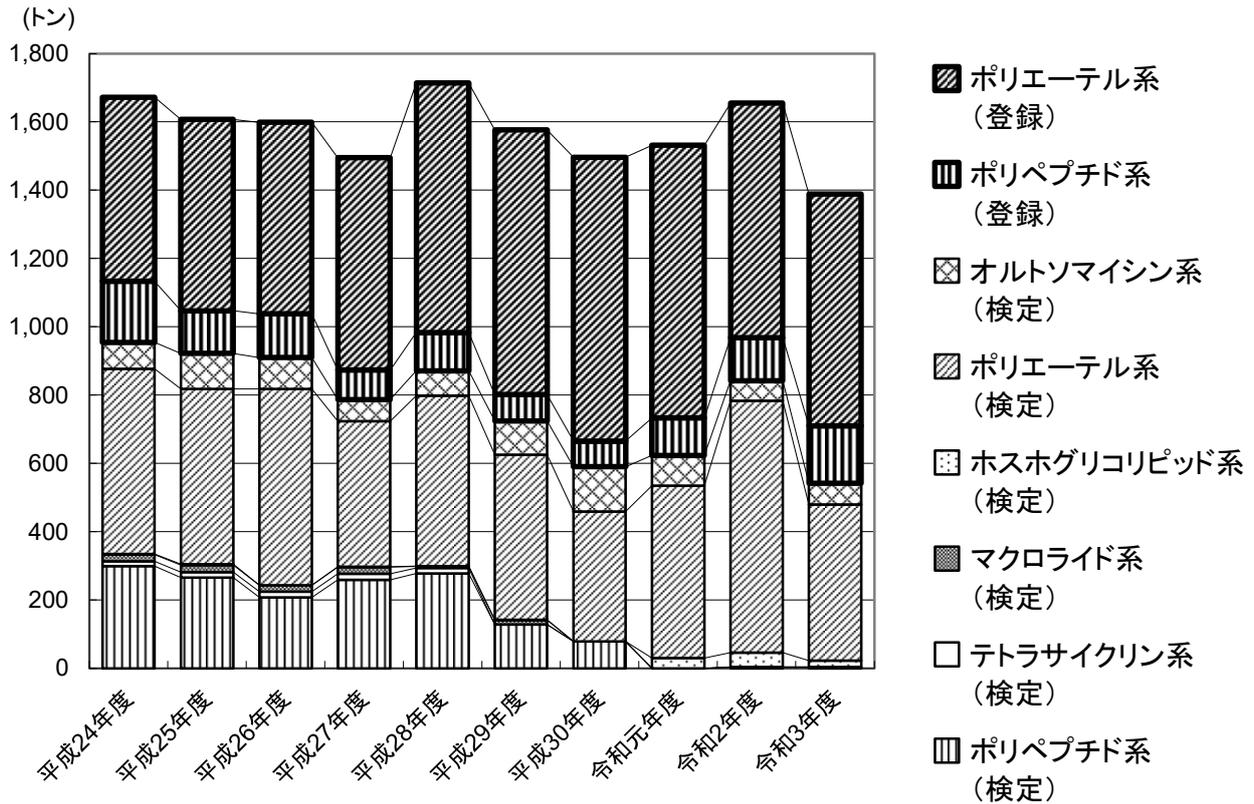


図1 特定添加物の総数量の推移 (類別)

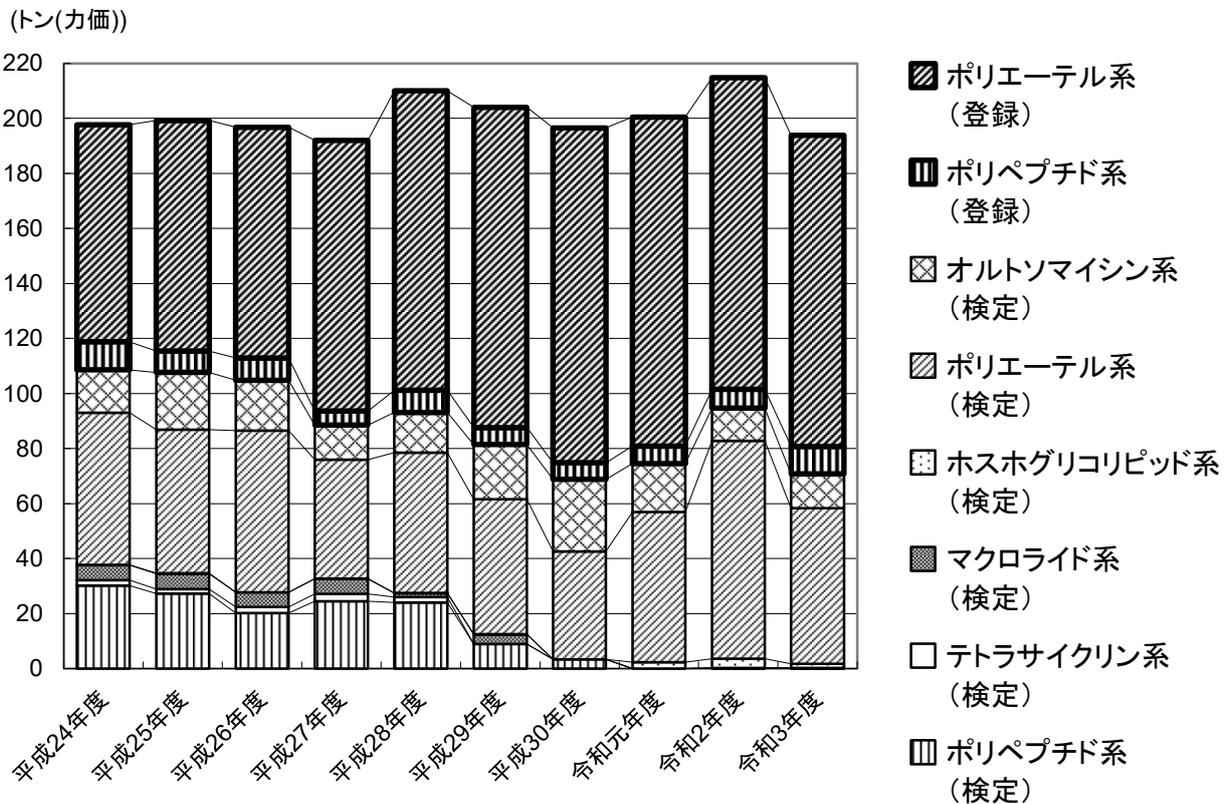


図2 特定添加物の総数の実量カ価換算量の推移 (類別)

7 要 約

- 1) 令和3年度の特定添加物の検定の結果は、以下のとおりである。
 - i 検定に合格した特定添加物は、3業者から申請された、5種類、7銘柄であった。
 - ii 検定合格件数は68件、合格数量は542トン、実量力価換算量は71トン(力価)で、前年度に比べて件数、数量及び実量力価換算量ともに減少した。
 - iii 検定に合格した特定添加物はすべて飼料級であり、精製級の実績はなかった。
 - iv 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、ナラシン、アビラマイシンの順に多かった。また、実量力価換算量も同様の結果であった。
 - v 検定合格数量を類別にみると、ポリペプチド系及びオルトソマイシン系は前年度に比べて増加したが、ホスホグリコリピッド系及びポリエーテル系は減少した。また、実量力価換算量も同様の結果であった。
- 2) 令和3年度の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。
 - i 登録特定飼料等製造業者に登録されているのは2業者2工場であったが、1業者1工場は年度途中で登録が廃止された。
 - ii 製造実績は1業者1工場で、5種類製造し、製造数量は847トン、実量力価換算量は123トン(力価)で、前年度に比べて、製造数量及び実量力価換算量ともに増加した。
 - iii 種類別にみると、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、ラサロシドナトリウム、サリノマイシンナトリウムの順に多かった。
- 3) 令和3年度の特定添加物の総数量等の結果は、以下のとおりである。

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、ラサロシドナトリウムの順に多かった。また、実量力価換算量では、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の順に多かった。

他誌掲載論文

(抄録)

- 1 愛玩動物用飼料中の無機ヒ素の液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析計による定量法

鈴木 知華, 野村 昌代, 奥富 幸

食品衛生学雑誌, 62(5), 139-147 (2021).

- 2 飼料中のゼアラレノン, ゼアララノン, ゼアラレノールおよびゼアララノールの分析法妥当性確認および日本における汚染実態

青山 幸二, 齋藤 晴文

JSM Mycotoxins, 72(1), 15-22 (2022).

- 3 LC-MS/MS による飼料中のクロルプロファミン定量法の試験室間共同試験

武田 然也, 倉島 ちなみ, 杉本 泰俊,
関口 好浩

食品衛生学雑誌, 63(3), 122-127 (2022).

飼料研究報告編集委員

委員長	功刀 豊	副委員長	嶋崎 洋子
	青山 幸二		橋本 仁康
	石橋 隆幸		原 秀樹
	大島 慎司		山多 利秋
	鈴木 知華		吉永 晋
	須永 善行		綿原 正志
	野崎 友春		

飼料研究報告 第47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/>

令和4年9月

編集 飼料研究報告編集委員会

印刷 名取印刷工業有限会社
東京都新宿区新小川町7番11号 名取第2ビル
TEL 03-3260-4767

リサイクル適性 

この印刷物は、印刷用の紙へ
リサイクルできます。