

ISSN 0286-4746

# Research Report of Animal Feed

Vol. 33  
April 2008

## 飼料研究報告

第33号

平成20年4月

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)

Saitama, Japan



## はしがき

『飼料研究報告』は、独立行政法人農林水産消費安全技術センターの飼料検査担当職員らが飼料及び飼料添加物の分析・鑑定技術の改善、検査・試験法の開発等を目指して行った調査・研究内容を毎年とりまとめているものです。今号は、昭和50年度の創刊以来33巻目の発刊となります。

2001年9月の我が国における牛海綿状脳症（BSE）発生を契機として、従前の我が国の飼料、畜産物を含めた食品安全行政のあり方が問われることとなりました。2003年7月には、食品安全基本法の制定及び飼料安全法をはじめとする食品の安全に関連する法律の改正がなされ、飼料は、「農業生産資材」の一つから「食の一環（フードチェーン）」としての位置づけに変わり、食品と同様の安全性確保が求められるようになりました。

2007年4月に統合・再編した独立行政法人農林水産消費安全技術センターは、“農場から食卓まで”のフードチェーン全体を通じて食の安全と消費者の信頼の確保を技術的側面から担う組織であり、飼料中の農薬やかび毒などの有害物質の複数成分の同時定量法、動物性たん白質検出のためのPCR法やELISA法の応用法、遺伝子組換え体飼料の検出法・定量法の開発などを行っております。

今般、飼料及び飼料添加物の分析・鑑定においても、ヒューマンエラーの回避、環境の均一化などによる信頼性の確保・向上が求められるとともに、より迅速、低コストで信頼性の高い分析手法や、新たな有害物質などに対する分析法の研究開発が求められており、このことを踏まえ、当センターにおいてもより一層の信頼性確保・分析法開発に取り組んでまいります。

今回とりまとめた研究成果には、既に公定法として農林水産省より通知されている「飼料分析基準」に記載されたものもあるほか、今後、同通知の改正、更にはその解説書である『飼料分析法・解説』（飼料分析基準研究会編著）の改訂の際、それぞれ追加収載されるものも少なくないものと考えております。

本研究報告が、飼料及び飼料添加物の品質と安全性の確保の一助となりますよう、関係各位には引き続き御指導、御鞭撻頂きますようお願い申し上げます。

平成20年4月

理事長 吉羽 雅昭



## 目 次

1 飼料中の EPTC 及び二臭化エチレンのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法	
屋方 光則, 鷺尾 和也 .....	1
2 飼料中のアジンホスメチル及びプロフェノホスのガスクロマトグラフ (FPD) による定量法	
矢本 亮介 .....	13
3 飼料中のアメトリン, シアナジン及びプロメトリンの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法	
野崎 友春, 山多 利秋 .....	26
4 飼料中のジクロロボス及びナレドのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法	
杉本 泰俊, 八木 寿治, 加藤 隆久, 伊藤 潤, 三井 由紀子, 白井 小枝 .....	39
5 乾牧草中のテブコナゾールのガスクロマトグラフ質量分析計による簡易定量法	
野村 昌代 .....	52
6 配合飼料中のサリノマイシンナトリウム, センデュラマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムの液体クロマトグラフ質量分析計による一斉微量定量法	
牧野 大作, 山田 美帆 .....	62
7 メライザキットによる飼料中の反すう動物由来たん白質の検出法	
関口 好浩, 草間 豊子 .....	78

## 技術レポート

- 1 飼料中の粗たん白質の燃焼法による定量法の妥当性確認  
八木 寿治, 榊原 良成, 吉永 晋, 福本 裕二,  
石黒 瑛一, 安井 明美 ..... 91
- 2 共通試料による飼料中の鉛の共同試験について  
森 有希子 ..... 99
- 3 飼料中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法に係る添加回収率等の確認及び共通試料による共同試験の結果について  
小森谷 敏一 ..... 101
- 4 とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル中の水分の測定  
山多 利秋 ..... 107
- 5 飼料中のクロラムフェニコールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法 (中間報告)  
山本 克己 ..... 110
- 6 DDGS からの DNA 抽出について  
会田 紀雄, 橋本 仁康 ..... 116
- 7 コンピューター・プログラムを利用した, 複数の動物を検出するプライマーの開発  
篠田 直樹, 吉田 知太郎, 草間 豊子 ..... 122

## 精度管理

- 1 平成 19 年度飼料の共通試料による分析鑑定について  
小野 雄造, 甲斐 茂浩, 福中 理絵, 杉本 泰俊,  
松藤 由貴子, 野村 昌代, 若宮 洋市 ..... 126

## 調査資料

- 1 飼料のサルモネラ汚染状況 (平成 19 年度)  
会田 紀雄 ..... 155
- 2 牛海綿状脳症の発生防止対策における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング結果 (平成 18 年度)  
草間 豊子 ..... 165

## CONTENTS

1	Determination of EPTC and Ethylene Dibromide in Feeds by GC-MS Mitsunori YAKATA and Kazuya WASHIO	1
2	Determination of Azinphos-methyl and Profenofos in Feeds by GC Ryosuke YAMOTO	13
3	Determination of Ametryn, Cyanazine and Prometryn in Feeds by LC-MS Tomoharu NOZAKI and Toshiaki YAMATA	26
4	Determination of Dichlorvos and Naled in Feeds by GC-MS Yasutoshi SUGIMOTO, Toshiharu YAGI, Takahisa KATOU, Jun ITOU, Yukiko MITSUI and Sae SHIRAI	39
5	Simplified Method for Determination of Tebuconazole in Grass Hay by GC-MS Masayo NOMURA	52
6	Simultaneous Microdetermination of Salinomycin Sodium, Semduramicin Sodium, Narasin, Monensin Sodium and Lasalocid Sodium in Formula Feed by LC-MS Daisaku MAKINO and Miho YAMADA	62
7	Assessment of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit Detecting Ruminant Protein in Pork Meat and Bone Meals Yoshihiro SEKIGUCHI and Toyoko KUSAMA	78
§	Technical report	91
§	Proficiency test	126
§	Investigative report	155





# 1 飼料中の EPTC 及び二臭化エチレンのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

屋方 光則<sup>\*1</sup>, 鷲尾 和也<sup>\*2</sup>

## Determination of EPTC and Ethylene Dibromide in Feeds by GC-MS

Mitsunori YAKATA<sup>\*1</sup> and Kazuya WASHIO<sup>\*2</sup>

(<sup>\*1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center,  
(Now Sapporo Regional Center),

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

An analytical method for determination of ethyl *N,N*-dipropylthiocarbamate (EPTC) and ethylene dibromide (EDB) in feed using a gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) was developed. First, 20.0 g of sample and 400 mL of water were placed into a 1 L Dean-Stark distilling flask. After 20 mL of hexane and about 0.2 mL of silicone were added, the flask was attached to the Dean-Stark distillation apparatus and reflux-heated for 60 minutes with a mantle heater. After being cooled, the water in the distillation trap was thrown away and the hexane layer was filtered to a 20 mL test tube with fluid phase separation filter paper and subjected to a GC-MS for determination of EPTC and EDB. A spike test was conducted with two kinds of formula feed, and two kinds of grains (corn and rye) spiked with 25 µg/kg and 200 µg/kg of EPTC, and 5 µg/kg and 200 µg/kg of EDB. The spike test on two kinds of formula feeds, corn and rye resulted in recoveries ranging from 88.1% to 95.5% of EPTC and from 96.2% to 103% of EDB, and in relative standard deviations (RSD) within 11% and 6.3% respectively. A collaborative study was conducted using corn and formula feed for finishing beef cattle spiked with EPTC and EDB at 40 µg/kg and 10 µg/kg respectively. The mean recovery of EPTC in corn was 109%, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) were 6.1% and 7.7% respectively. The mean recovery of EDB was 113%, and RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub> were 1.9% and 6.9%, respectively. The mean recovery of EPTC and EDB in formula feed for finishing beef cattle was 106% with RSD<sub>r</sub> of 5.8% and RSD<sub>R</sub> of 14%, and 106% with RSD<sub>r</sub> of 3.9% and RSD<sub>R</sub> of 11% respectively.

Key words: 残留農薬 pesticide residue ; チオカーバメート系除草剤 thiocarbamate herbicide ; EPTC ethyl *N,N*-dipropylthiocarbamate (EPTC) ; 二臭化エチレン ethylene dibromide (EDB) ; デイーン・スターク蒸留器 Dean-Stark distillation apparatus ; 共同試験 collaborative study ; ガスクロマトグラフ質量分析計 gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) ; 飼料 feed

<sup>\*1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター, 現 同札幌センター

<sup>\*2</sup> (独) 農林水産消費安全技術センター福岡センター

## 1 緒 言

EPTC (Fig. 1) はアメリカの Stauffer Chem 社が 1955 年に開発したチオカーバメート系除草剤であり、1 年生イネ科雑草及び広葉雑草に広範囲にわたり効果がある。日本では 1968 年に登録されたが、1979 年に登録失効している<sup>1)</sup>。厚生労働省の定める食品における残留基準値は、麦・穀類及び綿実で 0.1 ppm となっている<sup>2)</sup>。また、諸外国の牧草類の基準値は 0.1 ppm である。

二臭化エチレン (Fig. 1. 以下「EDB」という。) は、日本では 1956 年に登録された。ネコブセンチュウ等の土壌用殺線虫剤又は果実、穀物等のくん蒸剤として国内でも広く利用されていたが、EDB の発がん性の疑いが認められたことから 1984 年くん蒸の使用が全面禁止となり、1990 年に登録失効している<sup>3)</sup>。国内での飼料中の基準<sup>4)</sup>は、小麦が 0.1 ppm、とうもろこし、大麦、マイロ、ライ麦及びえん麦で 0.01 ppm となっている。現在、石黒ら<sup>5)</sup>が開発した定量法 (以下「石黒法」という。) が飼料分析基準<sup>6)</sup>に記載されている。石黒らはパックドカラムを用いたガスクロマトグラフィー (検出器: ECD) による定量を行っているが、キャピラリーカラムを使用した分析法の検討及び妥当性の確認が得られていない。

筆者らは、EPTC 及び EDB が共にディーン・スターク蒸留装置を用いた抽出が可能であることから、平成 18 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業において財団法人日本食品分析センターが開発した飼料中に残留する EPTC の定量法<sup>7)</sup> (以下「分析センター法」という。) 及び石黒法を基に、EPTC 及び EDB の同時定量法を検討し、良好な結果が得られたのでその概要を報告する。

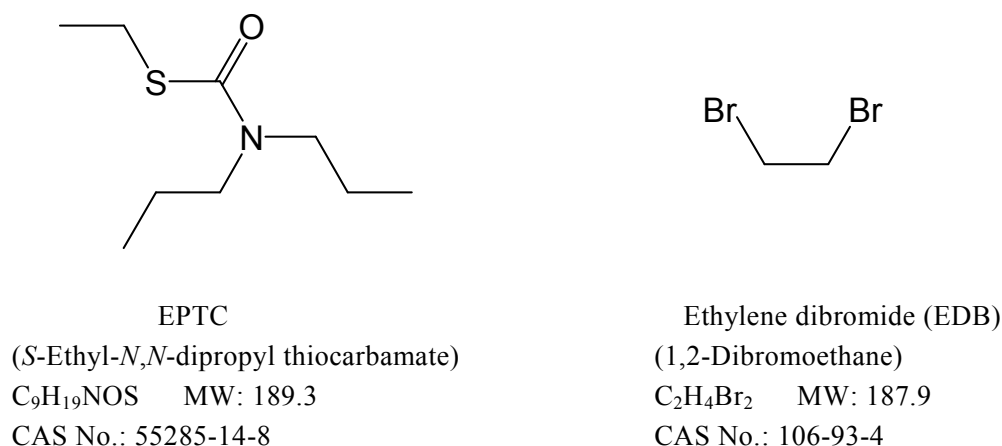


Fig. 1 Structure of EPTC and EDB

## 2 分析方法

### 2.1 試 料

市販の牛用配合飼料、鶏用配合飼料、とうもろこし及びライ麦をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎して用いた。なお、検討に用いた配合飼料の配合割合の一例を Table 1 に示した。

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

Kind of formula feed	Group of ingredients	Ratio (%)	Ingredients
For growing chick	Grains	59	Corn, Milo, Dehulled rice
	Oil meals	25	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn gluten
	Brans	3	Corn gluten feed
	Animal by products	1	Fish meal
	Others	12	Animal fat, Calcium carbonate, Calcium phosphate, Salt, Feed additives
For finishing beef cattle	Grains	60	Corn, Wheat, Barley, Roast soybean
	Brans	32	Wheat bran, Hominy feed
	Oil meals	7	Soybean meal
	Others	1	Calcium carbonate, Salt, Feed additives

## 2.2 試薬

### 1) EPTC 標準原液

EPTC 標準品 (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 97%) 25 mg を正確に量って 50 mL の褐色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 EPTC 標準原液を調製した (この液 1 mL は, EPTC として 0.5 mg を含有する. ) .

### 2) EDB 標準原液

EDB 標準品 (東京化成工業製, 純度 99%) 25 mg を正確に量って 50 mL の褐色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 EDB 標準原液を調製した (この液 1 mL は, EDB として 0.5 mg を含有する. ) .

### 3) 混合標準液

使用に際して, EPTC 及び EDB 標準原液の一定量を混合した後, ヘキサンで正確に希釈し, 1 mL 中に EPTC 及び EDB としてそれぞれ 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 及び 0.5 µg を含有する各混合標準液を調製した.

### 4) アセトン, ヘキサンは残留農薬分析用試薬を用いた.

### 5) 消泡用シリコーン油は添加物用を用いた.

## 2.3 装置及び器具

### 1) ガスクロマトグラフ質量分析計: 島津製作所製 GCMS-QP2010

### 2) ディーン・スターク蒸留装置: 桐山製作所製

### 3) マントルヒーター: 大科電気製 1 L 丸底フラスコ用

### 4) 液相分離用ろ紙: 東洋濾紙製 ADVANTEC 2S (直径 90 mm)

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

分析試料 20.0 g を量って 1 L のディーン・スターク用蒸留フラスコに入れ, 水 400 mL を加えた後, ヘキサン 20 mL 及び消泡用シリコーン油約 0.2 mL を加えディーン・スターク蒸留装置に取り付け, ディーン・スターク蒸留装置及び連結する冷却管の冷却水温度を 5°C に設定し,

マントルヒーターで 60 分間加熱還流した。放冷後、蒸留トラップ内の水を捨てヘキサン層を液相分離用ろ紙で 20 mL の試験管にろ過し、ガスクロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

## 2) ガスクロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各混合標準液各 2  $\mu\text{L}$  をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出 (SIM) クロマトグラムを得た。

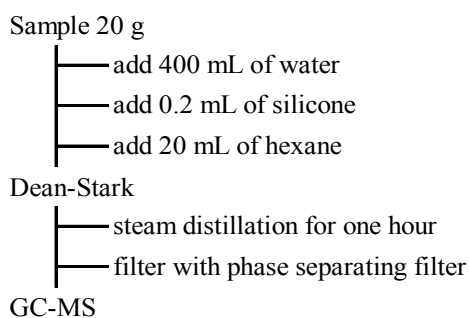
## 3) 計算

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 EPTC 量及び EDB 量を算出した。

なお、GC-MS の測定条件を Table 2 に、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

**Table 2 Operating conditions for GC-MS**

Column	DB-624 (0.32 mm i.d.×30 m, 1.8 $\mu\text{m}$ film thickness)
Column temp.	50°C →10°C/min→180°C →30°C/min→250°C (10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection temp.	250°C
Carrier gas	He 3.6 mL/min
Transferline temp.	280°C
Ion Source temp.	200°C
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	EPTC: $m/z$ 189 (quantitation), 128 (confirmation) EDB: $m/z$ 109 (quantitation), 107 (confirmation)



**Scheme 1 Analytical procedure for EPTC and EDB**

## 3 結果及び考察

### 3.1 検量線

調製した 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 及び 0.5  $\mu\text{g/mL}$  の各混合標準液各 2  $\mu\text{L}$  をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、得られた SIM クロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した。

その結果、検量線は EPTC 及び EDB ともに 0.002~1.0 ng の範囲で原点を通る直線性を示した。

### 3.2 抽出条件の検討

抽出方法として、分析センター法及び石黒法ともにディーン・スターク蒸留装置を用いて抽出

を行っていることから本法においても当該装置を用いた抽出の検討を行った。

分析センター法では、分析試料 10.0 g を量って 1 L のディーン・スターク用蒸留フラスコに入れ、水 200 mL を加えた後、ヘキサン 10 mL 及び消泡用シリコーン油約 0.2 mL を加え、60 分間加熱還流することとしている。石黒法では、分析試料 50.0 g を量って 1 L のディーン・スターク用蒸留フラスコに入れ、水 400 mL を加えた後、ヘキサン 15 mL 及び消泡用シリコーン油 1 滴を加え、60 分間加熱還流することとしている。本法では、EPTC として 10 µg/kg 及び EDB として 5 µg/kg 相当量を添加したとうもろこしを用いて、分析センター法及び同法の条件を基に分析試料を 20.0 g、水を 400 mL、ヘキサンを 20 mL に変更した方法（以下「倍量法」という。）の回収試験を実施した。

その結果、Table 3 のとおり倍量法の方が良好な結果が得られたことから、本法では分析センター法の条件を基に分析試料を 20.0 g、水を 400 mL、ヘキサンを 20 mL に変更した条件を採用することとした。

**Table 3 Recovery of EPTC and EDB spiked into corn**

Spiked level (µg/kg)	Recovery (%)			
	Method of Japan Food Research Laboratories		This method	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
EPTC 10	87.3	(15 )	97.0	( 5.7 )
EDB 5	88.7	( 5.7 )	94.0	( 2.1 )

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.3 冷却水温度の検討

ディーン・スターク蒸留装置及び冷却管に使用する冷却水温度について検討した。EPTC 及び EDB として 25 µg/kg 及び 10 µg/kg 相当量を添加した配合飼料（肉用牛肥育用）を用いて、冷却水温度を 5, 10, 15 及び 20°C に設定し、以下本法に従い回収試験を実施した。また、ヘキサンの捕集率についても調査した。その結果、Table 4 のとおり冷却水を 10°C 以上にした場合、ヘキサンは最初に加えた量を全量捕集出来なかった。これは加熱還流中にヘキサンが揮散したものと考えられた。また、EPTC 及び EDB の回収率については、EPTC は過回収、EDB は低回収となった。これは加熱還流中に EPTC はヘキサンの揮散により濃縮されたこと、EDB はヘキサンとともに揮散したことが原因と考えられた。冷却水温度を 10°C 以下に設定した場合、ヘキサンの捕集率及び回収率で良好な結果が得られたことから、本法では余裕を見て冷却水温度を 5°C とした。

**Table 4 Recovery of hexane, EPTC and EDB for several coolant temperatures**

Coolant temperature	Recovery rate of hexane <sup>a)</sup>	Recovery <sup>a)</sup> (%)	
		EPTC <sup>b)</sup>	EDB <sup>b)</sup>
20°C	85	111	91.4
15°C	95	111	89.3
10°C	100	104	99.1
5°C	100	106	98.0

a)  $n=1$ 

b) Spiked level of 25 µg/kg for EPTC and 10 µg/kg for EDB

## 3.4 測定条件の検討

ガスクロマトグラフ質量分析計に使用するカラムについて検討を行った。分析センター法では EPTC の定量に J&W 製（現 Agilent Technologies 製）HP-5MS の微極性カラムを採用している。石黒法では J&W 製 DB-WAX 等の高極性カラムを使用することとしている。EPTC 及び EDB を同時定量するにあたり各々の特性を考慮し、本法では J&W 製 DB-1701（低/中極性カラム）と J&W 製 DB-624（中極性/揮発性汚染物質分析カラム）のカラムを用いて検討を行った。EPTC として 25 µg/kg 及び EDB として 10 µg/kg 相当量を添加したとうもろこしを用いて回収試験を実施した。DB-624 を用いた測定条件は本法による。DB-1701 を用いた場合の測定条件は Table 5 のとおりである。

**Table 5 Operating conditions for GC-MS with DB-1701**

Column	DB-1701 (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 µm film thickness)
Column temp.	50°C →10°C/min→180°C →30°C/min→250°C (10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection temp.	250°C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temp	280°C
Ion Source temp.	200°C
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	$m/z$ 189, 128 (EPTC), 109, 107 (EDB)

その結果、Table 6 のとおり DB-1701 を用いた測定条件では、EPTC のピークときょう雑ピークが分離不十分（クロマトグラムは省略）のため回収率が過大に評価されていると考えられた。DB-624 を用いた測定条件では良好な結果が得られたことから、本法では DB-624 を使用した測定条件を採用することとした。

**Table 6 Recovery of EPTC and EDB spiked into corn determined by two types of column (%)**

Spiked level (µg/kg)	DB-1701		DB-624	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
EPTC 25	160	(18 )	90.3	(10 )
EDB 10	95.3	( 2.2 )	101	( 4.0 )

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

## 3.5 妨害物質の検討

配合飼料 6 種類（成鶏飼育用，幼すう育成用，子豚育成用，種豚育成用，乳用牛飼育用，肉用牛肥育用），穀類 6 種類（えん麦，大麦，小麦，マイロ，とうもろこし，ライ麦）及び乾牧草 2 種類（オーツヘイ及びチモシーヘイ）を用い，本法に従って選択イオン検出（SIM）クロマトグラムを作成したところ，EPTC 及び EDB の定量を妨害するピークは認められなかった。

## 3.6 添加回収試験

鶏用配合飼料，牛用配合飼料，とうもろこし及びライ麦に EPTC としてそれぞれ 25 及び 200 µg/kg，EDB としてそれぞれ 5 及び 200 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて，本法に従って回収率及び分析精度を検討した．その結果は Table 7 のとおりであり，EPTC の平均回収率は 88.1~95.5%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 11%以下であった．EDB については，平均回収率は 96.2~103%，その繰返し精度は RSD として 6.3%以下であった。

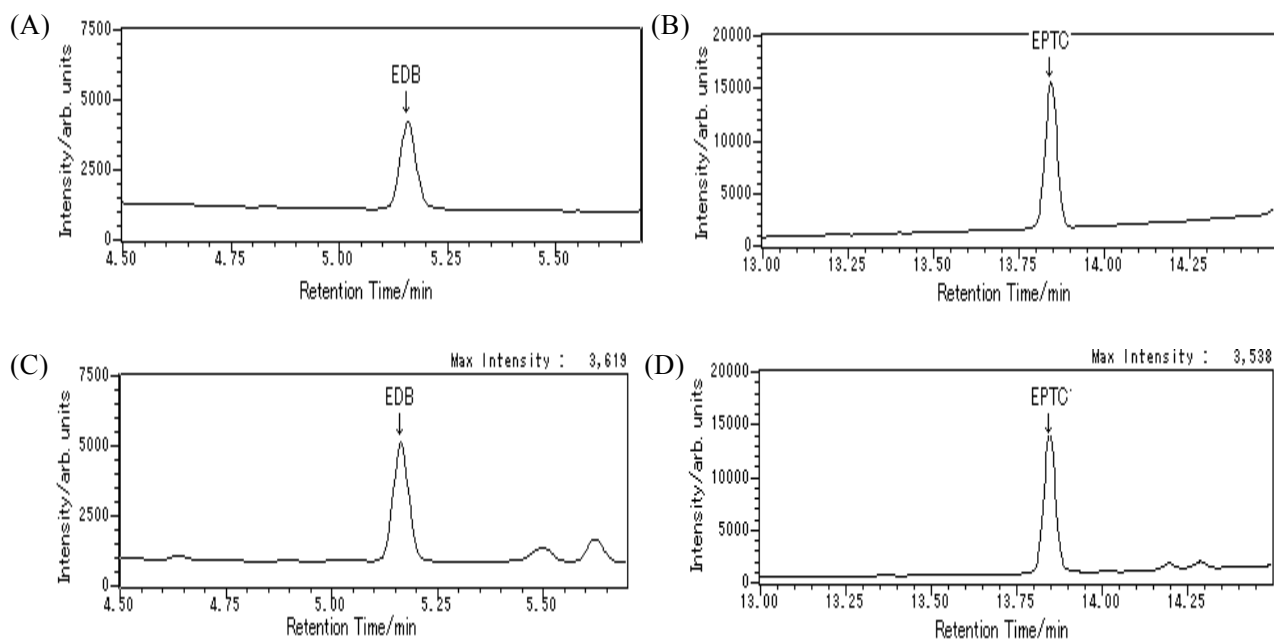
なお，添加回収試験で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

**Table 7 Recovery of EPTC and EDB spiked into four kinds of formula feed (%)**

Spiked level (µg/kg)	Formula feed for growing chick		Formula feed for finishing beef cattle		Corn		Rye		
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	
EPTC	25	91.9	( 8.2 )	88.5	(11 )	95.5	( 3.6 )	93.1	( 3.0 )
	200	88.1	(11 )	94.9	( 6.5 )	93.5	( 8.0 )	95.5	( 6.4 )
EDB	5	98.7	( 1.2 )	101	( 4.1 )	103	( 6.3 )	99.3	( 3.1 )
	200	96.2	( 3.5 )	101	( 1.8 )	99.3	( 1.7 )	98.2	( 1.3 )

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability



**Fig. 2 GC-MS chromatograms of standard solution and sample solution**

GC-MS conditions are shown in Table 2

(A) Standard solution (The amount of EDB is 0.02 ng)

(B) Standard solution (The amount of EPTC is 0.05 ng)

(C) Sample solution of spiked corn (spiked EDB at 10 µg/kg)

(D) Sample solution of spiked corn (spiked EPTC at 25 µg/kg)

### 3.7 定量下限及び検出下限

本法の定量下限を確認するために、牛用配合飼料に EPTC を、ライ麦に EDB をそれぞれ添加し、本法に従って分析を 3 回実施し、得られたピークの SN 比からそれぞれの定量下限及び検出下限を求めた。

牛用配合飼料に EPTC として 5 及び 10 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて本法に従って 3 回実施した結果、SN 比が 10 となる濃度は 10 µg/kg であり、EPTC の定量下限は 10 µg/kg と考えられた。添加量 10 µg/kg における平均回収率は Table 8 のとおり 98.3%，繰返し精度は RSD として 6.1%であった。また、EPTC の検出下限は SN 比が 3 となる濃度から 3 µg/kg と見積もられた。

**Table 8 Recovery of EPTC spiked into formula feed for beef (%)**

Spiked level (µg/kg)	Formula feed for beef (%)	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
EPTC	5	(10 )
	10	( 6.1 )

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

同様にライ麦に EDB として 1 及び 2 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて本法に従って 3 回実施した結果、SN 比が 10 となる濃度は 2 µg/kg であり、EDB の定量下限は 2 µg/kg と考えられた。



添加量 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  における平均回収率は Table 9 のとおり 96.7%，繰返し精度は RSD として 3.0% であった。また，EDB の検出下限は SN 比が 3 となる濃度から 0.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と見積もられた。

**Table 9 Recovery of EDB spiked into rye (%)**

Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Rye	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
EDB	1	117 ( 9.9 )
	2	96.7 ( 3.0 )

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.8 共同試験

本法の再現精度を調査するため，とうもろこし及び肉用牛肥育用配合飼料にそれぞれ EPTC として 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量及び EDB として 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用いて，アジレント・テクノロジー株式会社八王子事業所，財団法人日本食品分析センター多摩研究所，全国酪農業協同組合連合会分析センター，独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，同札幌センター，同名古屋センター，同神戸センター大阪事務所及び同福岡センターの 8 試験室において，本法に従って共同試験を実施した。

EPTC についての結果は Table 10 のとおりであり，とうもろこしでは，平均回収率は 109%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 6.1% 及び 7.7% であり，HorRat は 0.35 であった。

また，配合飼料では，平均回収率は 113%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$  として 1.9% 及び 6.9% であり，HorRat は 0.31 であった。

EDB についての結果は Table 11 のとおりであり，とうもろこしでは，平均回収率は 106%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$  として 5.8% 及び 14% であり，HorRat は 0.61 であった。

また，配合飼料では，平均回収率は 106%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$  として 3.9% 及び 11% であり，HorRat は 0.51 であった。

参考のため，各試験室で使用したガスクロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 12 に示した。

**Table 10 Collaborative study results of EPTC**

Lab. No.	(µg/kg)			
	Sample			
	Corn		Formula feed	
1	41.1	41.0	41.0	43.1
2	45.3	39.4	42.3	43.7
3	41.0	46.4	47.5	47.4
4	47.9	47.8	47.7	47.5
5	42.7	47.6	47.3	46.2
6	43.4	39.4	43.5	43.2
7	46.6	48.1	48.7	49.6
8	42.1	39.5	40.1	42.0
Spiked value	40.0		40.0	
Mean value <sup>a)</sup>	43.7		45.1	
Recovery (%)	109		113	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	6.1		1.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	7.7		6.9	
HorRat	0.35		0.31	

a)  $n=16$ 

b) Repeatability relative standard deviation within same laboratory

c) Reproducibility relative standard deviation

**Table 11 Collaborative study results of EDB**

Lab. No.	(µg/kg)			
	Sample			
	Corn		Formula feed	
1	10.9	9.04	10.7	9.61
2	10.2	11.5	10.8	10.5
3	10.3	10.4	10.4	10.4
4	13.8	13.8	13.1	13.4
5	9.06	9.72	9.22	9.67
6	10.3	10.5	10.5	9.67
7	10.1	10.3	10.6	10.2
8	9.56	10.1	10.5	9.90
Spiked value	10.0		10.0	
Mean value <sup>a)</sup>	10.6		10.6	
Recovery (%)	106		106	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	5.8		3.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	14		11	
HorRat	0.61		0.51	

a)  $n=16$ 

b) Repeatability relative standard deviation within same laboratory

c) Reproducibility relative standard deviation

**Table 12 Instruments used in the collaborative study**

Lab. No.	GC-MS	GC column (i.d.×length, film thickness)
1	Thermo ELECTRON CORPORATION FOCUS-Polaris Q GC/MS Benchtop Ion Trap Mass Spectrometer	Agilent Technologies DB-624 (0.32 mm i.d.×30 m, 1.8 µm)
2	GC: Agilent Technologies 6890 MS: Agilent Technologies 5973N	Agilent Technologies DB-624 (0.32 mm i.d.×30 m, 1.8 µm)
3	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5975B	Agilent Technologies DB-624 (0.32 mm i.d.×30 m, 1.8 µm)
4	GC: Agilent Technologies 7890 GC MS: Agilent Technologies 5975C MSD	Agilent Technologies DB-624 (0.32 mm i.d.×30 m, 1.8 µm)
5	Shimadzu GCMS-Q2010	Agilent Technologies DB-624 (0.32 mm i.d.×30 m, 1.8 µm)
6	Shimadzu GCMS-Q2010	Agilent Technologies DB-624 (0.32 mm i.d.×30 m, 1.8 µm)
7	Shimadzu GCMS-Q2010 Plus	Agilent Technologies DB-624 (0.32 mm i.d.×30 m, 1.8 µm)
8	Shimadzu GCMS-Q2010	Agilent Technologies DB-624 (0.32 mm i.d.×30 m, 1.8 µm)

#### 4 まとめ

ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた飼料中の EPTC 及び EDB の同時定量法について検討したところ、次の結果を得た。

- 1) ディーン・スターク蒸留装置による抽出条件で分析試料を 20.0 g, 水を 400 mL, ヘキサンを 20 mL にすることにより良好な結果を得た。
- 2) ディーン・スターク蒸留装置及び冷却管に使用する冷却水の温度を 5°C に設定することで良好な結果を得た。
- 3) ガスクロマトグラフ質量分析計に使用するカラムを DB-624 にした測定条件で良好な結果を得た。
- 4) EPTC 及び EDB の標準液の検量線は 0.002~1.0 ng の範囲で原点を通る直線性を示した。
- 5) 2 種類の配合飼料及び 2 種類の穀類に EPTC として 25 及び 200 µg/kg 相当量を添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 88.1~95.5% であり、繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 11% 以下であった。また、同様に EDB として 5 及び 200 µg/kg 相当量を添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 96.2~103% であり、繰返し精度は RSD として 6.3% 以下であった。
- 6) 本法による EPTC の定量下限は 10 µg/kg, 検出下限は 3 µg/kg と考えられた。また、EDB の定量下限は 2 µg/kg, 検出下限は 0.7 µg/kg と考えられた。
- 7) とうもろこし及び配合飼料 (肉用牛肥育用) に EPTC 及び EDB としてそれぞれ 40 µg/kg 及び 10 µg/kg 相当量を添加した共通試料を用いて、8 試験室において本法に従って共同分析を実施した。

その結果、とうもろこしの EPTC の平均回収率は 109%, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD<sub>i</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) として 6.1% 及び 7.7% であり、HorRat は 0.35 であ

った。EDB の平均回収率は 106%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $RSD_I$  及び  $RSD_R$ ) として 5.8% 及び 14% であり，HorRat は 0.61 であった。

また，配合飼料の EPTC の平均回収率は 113%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $RSD_I$  及び  $RSD_R$ ) として 1.9% 及び 6.9% であり，HorRat は 0.31 であった。EDB の平均回収率は 106%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $RSD_I$  及び  $RSD_R$ ) として 3.9% 及び 11% であり，HorRat は 0.51 であった。

### 謝 辞

共同試験にご協力いただいた，アジレント・テクノロジー株式会社，財団法人日本食品分析センター及び全国酪農業協同組合連合会の試験室の各位に感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) 財団法人日本植物防疫協会，農薬ハンドブック 1988 年度版編集委員会編集：農薬ハンドブック 1988 年度版 (1988).
- 2) 厚生省告示：“食品，添加物等の規格基準”，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959).
- 3) 武藤聡雄，株式会社技報堂：農薬概説 (1970).
- 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) 石黒瑛一：飼料研究報告，11，1 (1986).
- 6) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 7) 財団法人日本食品分析センター：平成 18 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2007).

## 2 飼料中のアジンホスメチル及びプロフェノホスのガスクロマトグラフ (FPD) による定量法

矢本 亮介\*

### Determination of Azinphos-methyl and Profenofos in Feeds by GC

Ryosuke YAMOTO\*

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

An analytical method for determination of azinphos-methyl and profenofos in feed using gas chromatography (GC) was developed. After addition of water to samples, azinphos-methyl and profenofos were extracted with acetonitrile and filtered. The filtrates were purified by gel permeation chromatography (GPC) and Florisil column chromatography, and subjected to capillary column GC for determination of azinphos-methyl and profenofos. A recovery test was conducted using two kinds of formula feed, wheat and cottonseed spiked with azinphos-methyl and profenofos at 50 µg/kg and 3,000 µg/kg. A recovery test was also conducted using ryegrass straw spiked with azinphos-methyl and profenofos at 50 µg/kg and 10,000 µg/kg. These tests resulted in recoveries of 76.3~116.5% of azinphos-methyl with relative standard deviations (RSD) of within 11.9% and recoveries of 88.0~119.5% of profenofos with RSD of within 10.3%. A collaborative study was conducted in eight laboratories using a formula feed and alfalfa hay spiked with azinphos-methyl and profenofos at 100 µg/kg. The mean recovery of azinphos-methyl in formula feed was 88.0%, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations ( $RSD_r$  and  $RSD_R$ ) were 7.2% and 9.7% respectively. The mean recovery of profenofos in formula feed was 92.4%, and the repeatability and reproducibility in terms of  $RSD_r$  and  $RSD_R$  were 7.0% and 14% respectively. The mean recoveries of azinphos-methyl and profenofos in alfalfa hay were 99.3% with  $RSD_r$  of 4.1% and  $RSD_R$  of 12%, and 96.6% with  $RSD_r$  of 6.8% and  $RSD_R$  of 12% respectively.

Key words: 残留農薬 pesticide residue ; 有機リン系殺虫剤 organophosphorus insecticide ; アジンホスメチル azinphos-methyl ; プロフェノホス profenofos ; ガスクロマトグラフィー gas chromatography (GC) ; ゲル浸透クロマトグラフィー gel permeation chromatography (GPC) ; 綿実 cottonseed ; 共同試験 collaborative study ; 飼料 feed ; 乾牧草 grass hay

### 1 緒 言

アジンホスメチル [C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>PS<sub>2</sub>] (Fig. 1) は, Bayer 社が開発した有機リン系殺虫剤である. 国内の食品中の残留基準値は, とうもろこしで 2 mg/kg, 豆類で 0.05~0.5 mg/kg, いも類で 0.05~0.5 mg/kg, 野菜で 0.2~5 mg/kg, 果実で 0.1~5 mg/kg である<sup>1)</sup>.

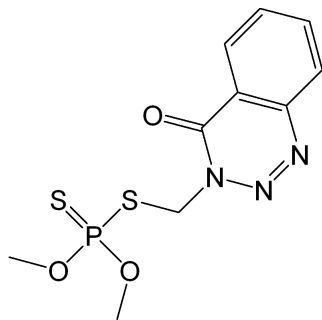
プロフェノホス [C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>BrClO<sub>3</sub>PS] (Fig. 1) は, スイスの Ciba Geigy 社が開発した非対称リン酸エ

\* 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

ステル構造を有する有機リン系殺虫剤である。国内の食品中の残留基準値は、穀類、豆類及び果実で 0.05 mg/kg, いも類で 0.02~0.05 mg/kg, 野菜で 0.05~5 mg/kg である<sup>1)</sup>。

これらの残留分析法として、アジンホスメチルについては、厚生労働省通知<sup>2)</sup>による「LC/MS による農薬等の一斉試験法」等、プロフェノホスについては、飼料分析基準<sup>3)</sup>による「ガスクロマトグラフ質量分析計による農薬の一斉分析法」等がある。

今回、財団法人日本食品分析センターが開発した「配合飼料中のアジンホスメチル及びプロフェノホスの残留分析法」<sup>4)</sup>を基に、飼料検査分析法（飼料分析基準）への適用性の可否についての検討を行ったので、その概要を報告する。



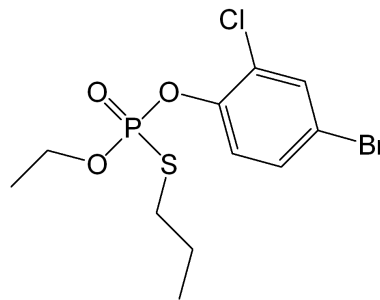
Azinphos-methyl

*S*-(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-ylmethyl)

*O,O*-dimethyl phosphorodithioate

$C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$  MW: 317.3

CAS No.: 86-50-0



Profenofos

*O*-(4-Bromo-2-chlorophenyl)-*O*-ethyl-*S*-propyl

phosphorothioate

$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$  MW: 373.6

CAS No.: 41198-08-7

**Fig. 1** Chemical structures of azinphos-methyl and profenofos

## 2 実験方法

### 2.1 試料

市販の配合飼料（成鶏飼育用及び乳用牛飼育用），小麦，綿実及び乾牧草（ライグラスストロー）を 1 mm の網ふるいを通すまで粉砕して用いた。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

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

Kind of formula feed	Group of ingredients	Ratio (%)	Ingredients
For layer	Grains	60	Corn, Milo, Rice
	Oil meals	27	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn gluten meal
	Animal by-products	1	Fish meal
	Brans	1	Wheat bran
	Others	11	Calcium carbonate, Animal fat, Calcium phosphate, Salt, Paprika extract, Silicic anhydride
For cattle	Grains	52	Corn, Lupins, Rice, Wheat
	Oil meals	22	Soybean meal, Rapeseed meal
	Brans	21	Corn gluten feed, Wheat bran, Distiller's dried grains with solubles, Screening pellet
	Others	5	Molasses, Calcium carbonate, Alfalfa meal, Salt

## 2.2 試 薬

### 1) アジンホスメチル標準原液

アジンホスメチル標準品（和光純薬工業製，純度 99.1%）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線までアセトンを加えてアジンホスメチル標準原液を調製した（この液 1 mL は，アジンホスメチルとして 0.5 mg を含有する．）。

### 2) プロフェノホス標準原液

プロフェノホス標準品（和光純薬工業製，純度 99.0%）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線までアセトンを加えてプロフェノホス標準原液を調製した（この液 1 mL は，プロフェノホスとして 0.5 mg を含有する．）。

### 3) 混合標準液

使用に際して，アジンホスメチル標準原液及びプロフェノホス標準原液各 1 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ，更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）を加えて，1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 10 µg を含有する混合標準原液を調製した。

更に，混合標準原液の一定量を 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）で正確に希釈し，1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 及び 1 µg を含有する各混合標準液を調製した。

### 4) アセトン，アセトニトリル，ヘキサンは残留農薬試験用試薬を，シクロヘキサン，2,2,4-トリメチルペンタンは高速液体クロマトグラフ分析用試薬を用いた。

## 2.3 装置及び器具

### 1) ガスクロマトグラフ：Agilent Technologies 製 6890N（FPD 検出器（リン検出用フィルター））

### 2) ゲル浸透クロマトグラフ：日本分光製 GPC システム

ポンプ：PU-980

オートサンプラー：AS-950

フラクションコレクター：SF-212N

### 3) 振とう機：タイテック製 レンプロシェーカー SR-2W

### 4) エバポレーター：東京理化学器械製 NAJ-160

- 5) フロリジルカートリッジ：Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil
- 6) メンブランフィルター：関東化学製 HLC-DISK 25 (孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , 直径 25 mm)

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 10 mL を加えて潤し、30 分間静置した後、アセトニトリル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。300 mL のなす形フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、容器及び残さをアセトニトリル 50 mL で洗浄し、吸引ろ過した。ろ液を 40°C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。シクロヘキサン-アセトン (7+3) 10 mL (綿実は 20 mL) を正確に加えて残留物を溶かし、10 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、3,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をメンブランフィルター (孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ) でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

### 2) ゲル浸透クロマトグラフィー

試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、アジンホスメチル及びプロフェノホスが溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40°C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。ゲル浸透クロマトグラフの条件を Table 2 に示した。

ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かし、カートリッジカラムクロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

**Table 2 Operating conditions for GPC**

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d. $\times$ 300 mm, 15 $\mu\text{m}$ )
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d. $\times$ 100 mm, 15 $\mu\text{m}$ )
Eluent	Cyclohexane-acetone (7:3)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	70~120 mL

### 3) カートリッジカラムクロマトグラフィー

フロリジルカートリッジを注射筒に連結し、予めヘキサン 5 mL でカラムを洗浄した。試料溶液を注射筒に入れ、容器をヘキサン 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次フロリジルカートリッジに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。

50 mL のなす形フラスコをフロリジルカートリッジの下に置き、ヘキサン-アセトン (17+3) 15 mL を加えてアジンホスメチル及びプロフェノホスを溶出させ、溶出液を 40°C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

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

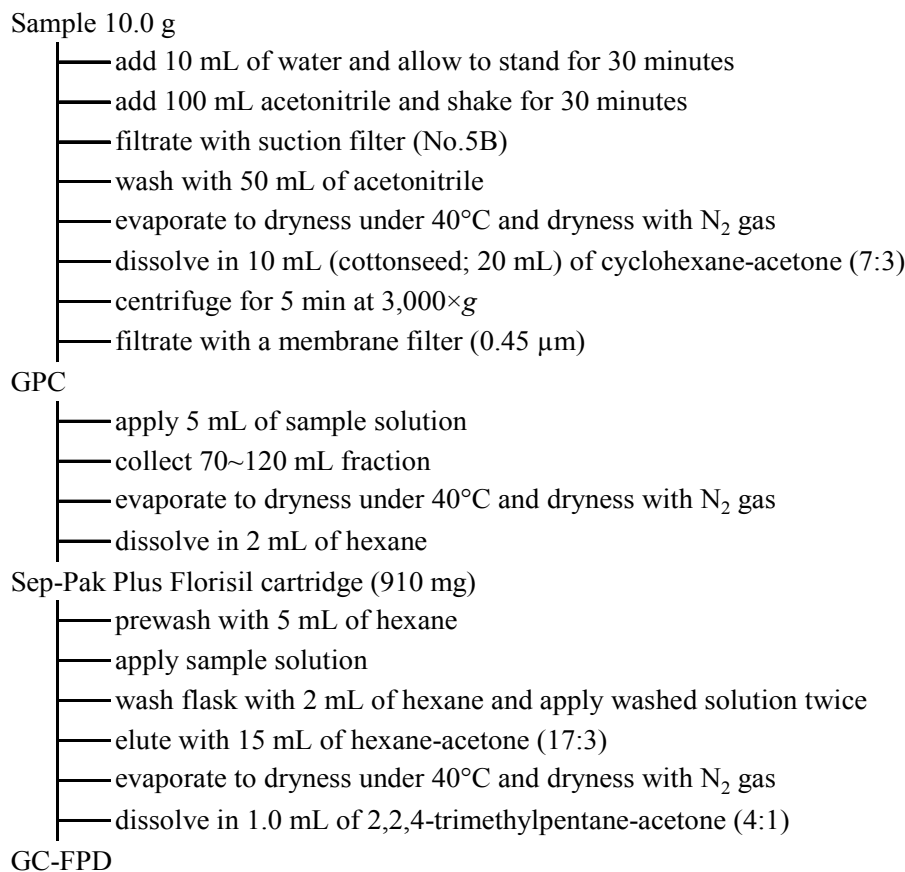
### 4) ガスクロマトグラフィー

試料溶液及び各混合標準液各 2  $\mu\text{L}$  をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得た。

得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のアジンホスメチル量及びプロフェノホス量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に、ガスクロマトグラフィーの測定条件を Table 3 に示した。



**Scheme 1 Analytical procedure for azinphos-methyl and profenofos****Table 3 Operating conditions for GC**

Column	Rtx-200 (0.25 mm i.d.× 15 m, 0.25 μm film thickness)
Column temp.	70°C (1 min)→20°C/min→250°C (4 min)
Injection mode	Splitless
Injection temp.	250°C
Carrier gas	He 2.0 mL/min
Hydrogen	75 mL/min
Air	100 mL/min
Make up gas	He (30 mL/min)
Detector	FPD
Detector temp.	250°C
Injection volume	2 μL

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

調製した 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 及び 1.0 μg/mL の各農薬混合標準液 2 μL をガスクロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した。

その結果、いずれの検量線とも 0.02~2 ng の範囲で原点を通る直線性を示した。

#### 3.2 ゲル浸透クロマトグラフィーの検討

ゲル浸透クロマトグラフィーにおけるアジンホスメチル及びプロフェノホスの溶出画分の確認を行

った。

1 mL 中に各農薬として 1.0  $\mu\text{g}$  を含有する標準液を調製し、5 mL を正確にとり、乾固した後、シクロヘキサン-アセトン (7+3) 10 mL に溶解し、2.4 の 2) のゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とし、60 mL から 130 mL における溶出画分の回収率を確認した。

その結果、Table 4 のとおりアジンホスメチル及びプロフェノホスはシクロヘキサン-アセトン (7+3) で 70~120 mL の区分で溶出していることから、本法では 70~120 mL の画分を分取することとした。

**Table 4 Elution pattern from GPC (standard solution)**

	Fraction volume (mL)								(%)
	60~65	~70	~75	~80	~85	~90	~95	~100	
Azinphos-methyl	0	0	0	0	0	0	0	2	
Profenofos	0	0	1	29	54	13	0	0	

	Fraction volume (mL)							Total
	~105	~110	~115	~120	~125	~130		
Azinphos-methyl	26	46	14	1	0	0	89	
Profenofos	0	0	0	0	0	0	97	

### 3.3 カートリッジカラムクロマトグラフィーの検討

カートリッジカラムクロマトグラフィーにおけるアジンホスメチル及びプロフェノホスの溶出画分の確認を行った。

1 mL 中に各農薬として 1.0  $\mu\text{g}$  を含有する標準液を調製し、1 mL を正確にとり乾固した後に、ヘキサン 2 mL に溶解し、2.4 の 3) のカートリッジカラムクロマトグラフィーにより、0 mL から 30 mL における溶出画分の回収率を確認した。

その結果、Table 5 のとおりアジンホスメチル及びプロフェノホスはヘキサン-アセトン (17+3) で 0~15 mL の区分で溶出していることから、本法ではヘキサン-アセトン (17+3) 15 mL で溶出することとした。

**Table 5 Elution pattern from Florisil cartridge (standard solution)**

	Fraction volume (mL)						(%)
	0~5	~10	~15	~20	~30	Total	
Azinphos-methyl	52	50	1	0	0	103	
Profenofos	100	0	0	0	0	100	

### 3.4 ガスクロマトグラフィーの検討

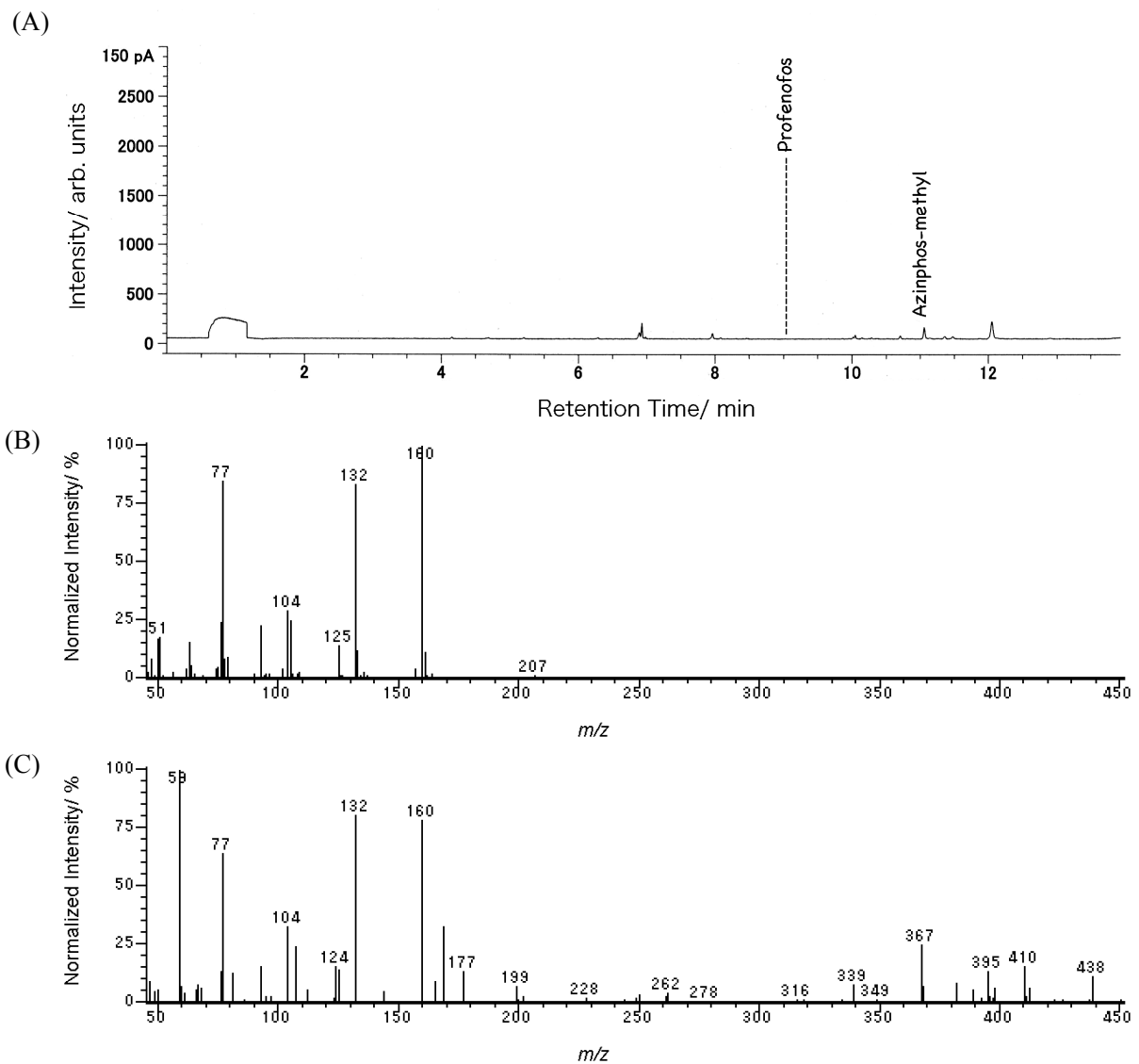
ガスクロマトグラフィーの測定条件について検討を行った。

グラスウール入りのインサートを使用すると、標準液のレスポンスが低下し、添加回収試験における過回収が生じたため、グラスウールが詰められていないインサートを用いることとした。

### 3.5 妨害物質の検討

配合飼料（成鶏飼育用，子豚育成用，乳用牛飼育用），小麦，大麦，スクリーニングペレット，ふすま，綿実及び乾牧草（ライグラスストロー，クレイングラスヘイ，アルファルファヘイ）を用い，本法に従って操作し，クロマトグラムを作成した．その結果，アジンホスメチル及びプロフェノホスの定量を妨害するピークは認められなかった．なお，アルファルファからアジンホスメチルと保持時間が一致するピークの痕跡が確認されたが，GC-MS を用いて当該ピークのマススペクトルを測定したところ，アジンホスメチルのマススペクトルとの一致を確認した．

なお，妨害物質の検討で得られたクロマトグラムの一例及び GC-MS で得られた当該ピークのマススペクトルを Fig. 2 に示した．



**Fig. 2** Example of chromatograms and mass spectra of azinphos-methyl in alfalfa hay

(A) Chromatogram of sample solution of alfalfa hay (not spiked)

(B) Mass spectrum of azinphos-methyl in standard solution

(C) Mass spectrum of azinphos-methyl in contaminated alfalfa hay

## 3.6 添加回収試験

配合飼料（成鶏飼育用及び乳用牛飼育用），小麦及び綿実（ライグラスストロー）にアジンホスメチル及びプロフェノホスとして 50 及び 3,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を，また乾牧草（ライグラスストロー）にアジンホスメチル及びプロフェノホスとして 50 及び 10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量をそれぞれ添加した試料を用いて，本法に従って分析を 3 回実施し，回収率及び繰返し精度を検討した．その結果は Table 6 のとおりであり，アジンホスメチルの平均回収率は 76.3~117%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 12%以下であった．また，プロフェノホスの平均回収率は 88.0~120%，その繰返し精度は RSD として 10%以下であった．

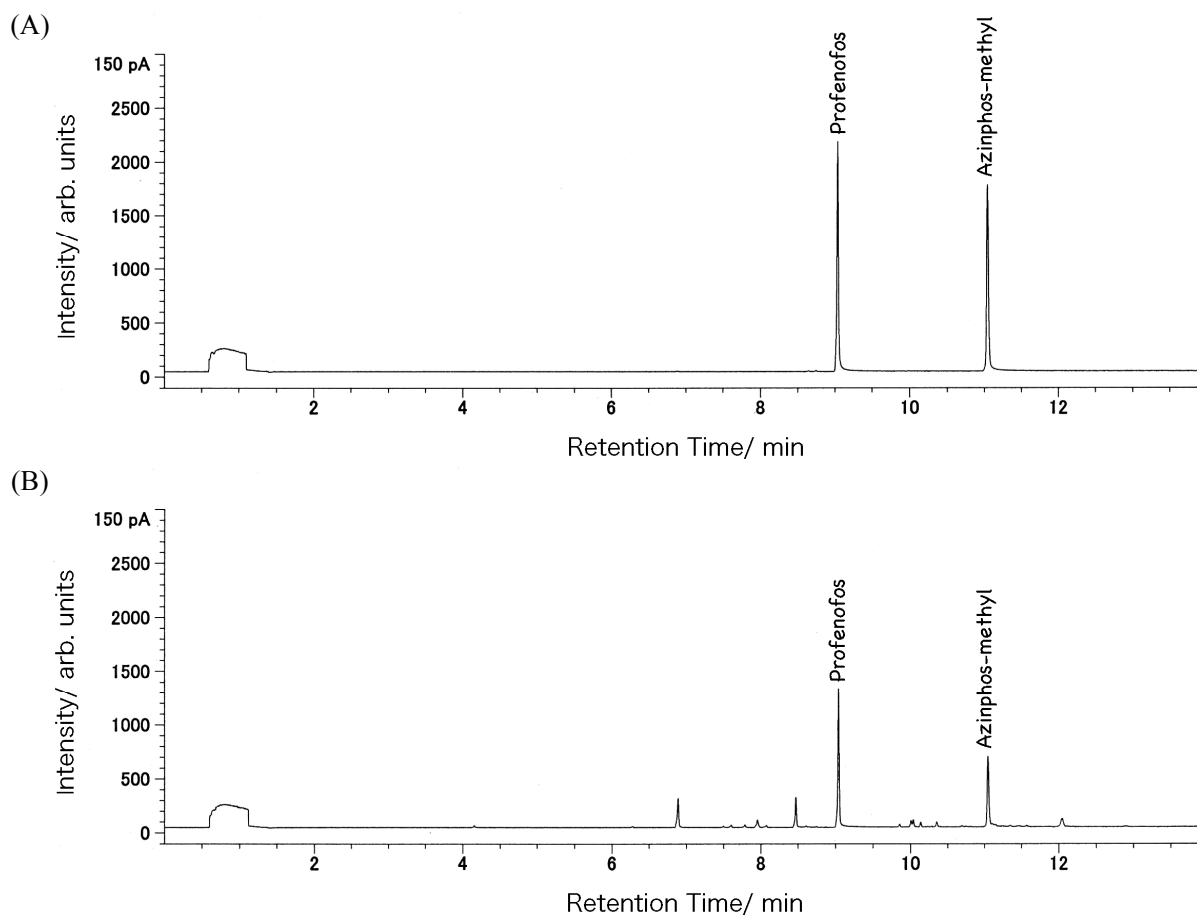
なお，添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した．

Table 6 Recovery test of azinphos-methyl and profenofos

	Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	(%)									
		Formula feed for layer		Formula feed for cattle		Wheat		Cottonseed		Ryegrass straw	
		Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
Azinphos-methyl	10,000	---	---	---	---	---	---	---	---	78.3	( 4.2)
	3,000	104	( 2.4)	78.7	( 4.3)	86.4	( 1.7)	112	( 4.6)	---	---
	50	104	( 3.3)	76.3	(12 )	111	( 2.0)	117	( 3.3)	88.7	( 8.8)
Profenofos	10,000	---	---	---	---	---	---	---	---	88.0	( 3.4)
	3,000	92.9	(10 )	96.6	( 3.5)	98.5	( 1.0)	114	( 4.5)	---	---
	50	110	( 0.7)	105	( 7.7)	110	( 2.8)	120	( 0.8)	99.4	( 3.7)

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability



**Fig. 3 Example of chromatograms of recovery test**

(A) Standard solution (The amount of each pesticide is 1 ng.)

(B) Sample solution of formula feed for cattle spiked each pesticide at 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$

### 3.7 定量下限及び検出下限

本法による定量下限を確認するために、配合飼料（乳用牛飼育用）及び乾牧草（ライグラスストロー）にアジンホスメチル及びプロフェノホスとして 5 及び 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を、また綿実にアジンホスメチル及びプロフェノホスとして 10 及び 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量をそれぞれ添加した試料を用いて、本法に従って分析を 3 回実施し、得られたピークの  $SN$  比を求めた。

その結果、得られたピークの  $SN$  比が 10 となる濃度は、アジンホスメチル及びプロフェノホス共に 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （綿実は 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）であったが、Table 7 のとおり添加量 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （綿実は 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）における試料では、アジンホスメチルでは平均回収率 108~128%，繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 9.1~23%，プロフェノホスでは平均回収率 100~151%，繰返し精度は RSD として 9.5~23%であった。

添加量 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （綿実は 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）における試料では、アジンホスメチルでは平均回収率 90.9~110%，繰返し精度は RSD として 3.9~13%，プロフェノホスでは平均回収率 105~112%，繰返し精度は RSD として 1.4~8.3%とほぼ良好な結果であった。

以上の結果から、本法の定量下限はそれぞれ 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （綿実は 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）程度であると考えられた。また、検出下限はピークの  $SN$  比が 3 となる濃度からそれぞれ 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （綿実は 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）程度であると見積もられた。

Table 7 Recovery test to define the limit of quantification

	Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	(%)					
		Formula feed for cattle		Ryegrass straw		Cottonseed	
		Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
Azinphos- methyl	20	---	---	---	---	110	( 3.9)
	10	90.9	( 13 )	108	( 12 )	128	( 23 )
	5	108	( 17 )	111	( 9.1)	---	---
Profenofos	20	---	---	---	---	109	( 3.7)
	10	112	( 1.4)	105	( 8.3)	151	( 23 )
	5	131	( 13 )	100	( 9.5)	---	---

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.8 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通飼料による共同試験を実施した。

配合飼料（乳用牛飼育用）及び乾牧草（アルファルファヘイ）にアジンホスメチル及びプロフェノホスとしてそれぞれ 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用い、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、財団法人マイコトキシン検査協会、全国酪農業協同組合連合会分析センター、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同名古屋センター、同福岡センター、同神戸センター大阪事務所及び同札幌センターの計 8 試験室で共同分析を実施した。

アジンホスメチルについての結果は Table 8 のとおりであり、配合飼料では、平均回収率は 88.0%、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 7.2%及び 9.7%であり、HorRat は 0.44 であった。また、乾牧草では、平均回収率は 99.3%、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 4.1%及び 12%であり、HorRat は 0.54 であった。

プロフェノホスについての結果は Table 9 のとおりであり、配合飼料では、平均回収率は 92.4%、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 7.0%及び 14%であり、HorRat は 0.65 であった。また、乾牧草では、平均回収率は 96.6%、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 6.8%及び 12%であり、HorRat は 0.56 であった。

配合飼料中のアジンホスメチルについて HorRat が 0.5 を下回っていたが、他の値 (0.54, 0.56 及び 0.65) と比較して特に異常があったとは考えられなかった。

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

**Table 8 Collaborative study results of azinphos-methyl**

Lab. No.	Sample			
	Formula feed for cattle		Alfalfa hay	
1	89.6	97.5	112	113
2	96.9	92.1	91.8	105
3	96.9	99.5	116	112
4	77.4	83.5	93.5	95.0
5	84.1	96.7	94.3	91.6
6	92.0	80.8	85.7	84.1
7	83.4	83.0	112	107
8	85.0	70.1	90.7	84.8
Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	100		100	
Mean value <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	88.0		99.3	
Recovery (%)	88.0		99.3	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	7.2		4.1	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	9.7		12	
HorRat	0.44		0.54	

a)  $n=16$ 

b) Repeatability relative standard deviation within same laboratory

c) Reproducibility relative standard deviation

**Table 9 Collaborative study results of profenofos**

Lab. No.	Sample			
	Formula feed for cattle		Alfalfa hay	
1	97.7	103	107	110
2	86.8	82.4	76.8	90.6
3	86.7	104	113	101
4	80.8	82.3	81.8	88.4
5	94.3	97.9	102	89.5
6	74.6	66.9	90.9	83.1
7	102	103	106	115
8	116	100	96.4	94.1
Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	100		100	
Mean value <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	92.4		96.6	
Recovery (%)	92.4		96.6	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	7.0		6.8	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	14		12	
HorRat	0.65		0.56	

a)  $n=16$ 

b) Repeatability relative standard deviation within same laboratory

c) Reproducibility relative standard deviation

Table 10 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC	Column (i.d.×length, filmthickness)
1	Agilent Technologies 6890N	RESTEK Rtx-200 (0.25 mm i.d.×15 m, 0.25 μm)
2	Agilent Technologies 6890N	RESTEK Rtx-200 (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
3	Agilent Technologies 6890N	RESTEK Rtx-200 (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
4	SHIMADZU GC-17A	RESTEK Rtx-200 (0.32 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
5	HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II	RESTEK Rtx-200 (0.25 mm i.d.×15 m, 0.25 μm)
6	Agilent Technologies 6890	RESTEK Rtx-200 (0.25 mm i.d.×15 m, 0.25 μm)
7	SHIMADZU GC-2010	Agilent DB-210 (0.25 mm i.d.×15 m, 0.25 μm)
8	Agilent Technologies 6890	J&W DB-200 (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)

#### 4 まとめ

ガスクロマトグラフ (FPD) を用いた飼料中のアジンホスメチル及びプロフェノホスの定量法について検討したところ、次の結果を得た。

- 1) アジンホスメチル及びプロフェノホス標準液の検量線は 0.02~2 ng の範囲で直線性を示した。
- 2) 本法によりアジンホスメチル及びプロフェノホスの定量を妨げるピークの確認をした結果、妨害ピークは認められなかった。
- 3) アジンホスメチル及びプロフェノホスを 2 種類の配合飼料、小麦及び綿実に 50 及び 3,000 μg/kg、乾牧草に 50 及び 10,000 μg/kg を添加し添加回収試験を実施した結果、平均回収率はアジンホスメチルで 76.3~117%、プロフェノホスで 88.0~120%であり、繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として、アジンホスメチルで 12%以下、プロフェノホスで 10%以下の結果が得られた。
- 4) 本法によるアジンホスメチル及びプロフェノホスの定量下限は 10 μg/kg (綿実は 20 μg/kg) , 検出下限は 2 μg/kg (綿実は 3 μg/kg) 程度であると考えられた。
- 5) 配合飼料及び乾牧草にアジンホスメチル及びプロフェノホスとしてそれぞれ 100 μg/kg 相当量を添加した試料を用いて、8 試験室で本法による共同試験を実施した。その結果、アジンホスメチルについての配合飼料における平均回収率は 88.0%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) として 7.2%及び 9.7%であり、HorRat は 0.44 であった。また、乾牧草における平均回収率は 99.3%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 4.1%及び 12%であり、HorRat は 0.54 であった。

プロフェノホスについての配合飼料における平均回収率は 92.4%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 7.0%及び 14%であり、HorRat は 0.65 であった。また、乾牧草における平均回収率は 96.6%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 6.8%及び 12%であり、HorRat は 0.56 であった。



## 謝 辞

共同試験に参加していただいた財団法人日本食品分析センター多摩研究所，財団法人マイコトキシン検査協会及び全国酪農業協同組合連合会分析センターの各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 厚生省告示：“食品，添加物等の規格基準”，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959).
- 2) 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).
- 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) 財団法人日本食品分析センター：“配合飼料中のアジンホスメチル及びプロフェノホスの残留分析法”，平成 15 年度有害物質調査事業微量分析法の開発事業，飼料中の農薬の分析法の開発 (2004).

### 3 飼料中のアメトリン, シアナジン及びプロメトリンの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

野崎 友春<sup>\*1</sup>, 山多 利秋<sup>\*2</sup>

#### Determination of Ametryn, Cyanazine and Prometryn in Feeds by LC-MS

Tomoharu NOZAKI<sup>\*1</sup> and Toshiaki YAMATA<sup>\*2</sup>

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

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

An analytical method for determination of ametryn, cyanazine and prometryn in feeds using a liquid chromatography-mass spectrometer (LC-MS) was developed. Ametryn, cyanazine and prometryn were extracted with acetone-water and filtered. The filtrates were re-extracted with acetonitrile (saturated with hexane), and purified by graphitized carbon black/ aminopropyl column chromatography and Florisil column chromatography, and subjected to LC-MS for determination of ametryn, cyanazine and prometryn. A recovery test was conducted using formula feed for starting broiler chicks and sudangrass hay spiked with ametryn, cyanazine and prometryn at 10 and 100 µg/kg. The mean recoveries of ametryn were in the range of 80.4~93.5% with the relative standard deviation of within 5.9%. These values were 74.7~95.7% and 5.4% for cyanazine, 73.8~87.3% and 4.0% for prometryn respectively. A recovery test to identify the limit of detection and limit of quantification was conducted using formula feed for starting broiler chicks and sudangrass hay spiked with ametryn, cyanazine and prometryn at 2 µg/kg. The mean recoveries of ametryn, cyanazine and prometryn were 77.2~82.9%, 79.2~89.5% and 87.2~94.5% and the RSD were 1.8~4.4%, 5.4~9.4% and 3.1~6.6% respectively. A collaborative study was conducted in nine laboratories using formula feed for starting broiler chick and sudangrass hay spiked with ametryn, cyanazine and prometryn at 10 µg/kg respectively. The mean recovery of ametryn in formula feed was 98.4%, repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>I</sub> and RSD<sub>R</sub>) were 4.3% and 6.2% respectively, and HorRat was 0.28. The mean recovery of cyanazine was 98.9% with RSD<sub>I</sub> of 6.6%, RSD<sub>R</sub> of 9.4% and HorRat of 0.43 respectively. The mean recovery of prometryn was 93.6% with RSD<sub>I</sub> of 2.7%, RSD<sub>R</sub> of 6.1% and HorRat of 0.28 respectively. For sudangrass hay, these values were 92.2%, 4.2%, 15% and 0.66 for ametryn, 94.4%, 4.1%, 17% and 0.76 for cyanazine and 89.6%, 3.2%, 11% and 0.52 for prometryn respectively.

Key words: 残留農薬 pesticide residue ; トリアジン系除草剤 triazine herbicide ; アメトリン ametryn ; シアナジン cyanazine ; プロメトリン prometryn ; 残留農薬 pesticide residue ; 液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatography-mass spectrometer (LC-MS) ; 飼料 feed ; 穀類 grain ; 乾牧草 grass hay ; 共同試験 collaborative study

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

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

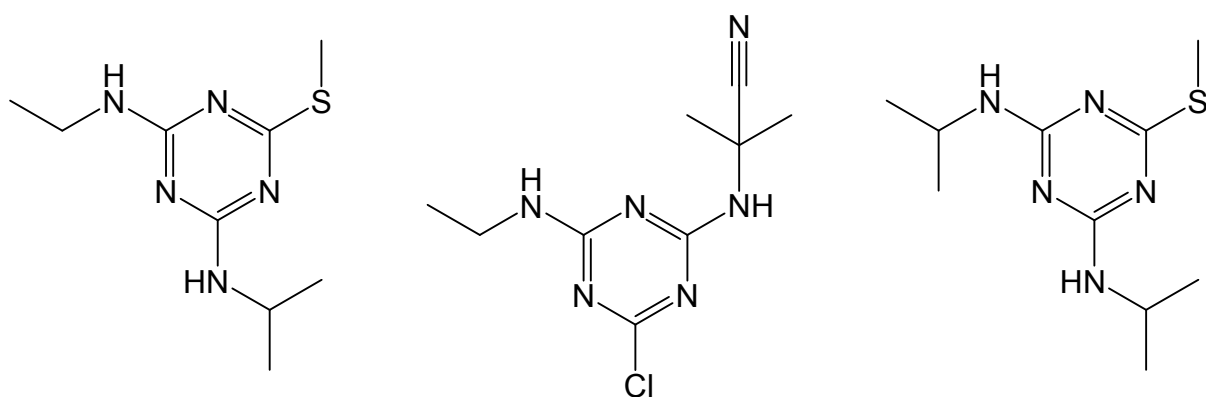
## 1 緒 言

食品衛生法に基づく残留農薬のポジティブリスト制度の導入に伴い、飼料及び飼料添加物についても平成 18 年 5 月 29 日付けで飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）の一部が改正され、飼料中の残留農薬（60 種類）の基準値が設定された。

シアナジンは、Shell Chemical 社によって開発されたトリアジン系除草剤であり、日本では、ばれいしょ等に使用されている。米国ではとうもろこしに使用されている。先の飼料中の残留農薬の基準において、シアナジンの基準値については、小麦及びとうもろこしで 0.1 mg/kg、大麦で 0.05 mg/kg、ライ麦、えん麦、マイロ及び乾牧草で 0.01 mg/kg と設定されたが、平成 16 年に通知された分析方法<sup>1)</sup>では、乾牧草中の分析法について検討がなされていないこと及び定量下限（0.01 mg/kg）が基準値と同レベルであること並びに平成 16 年度に財団法人日本食品分析センターが検討したガスクロマトグラフ質量分析計を用いた飼料中の残留農薬一斉分析<sup>2)</sup>ではシアナジンの回収率が低かったことから、今回、平成 18 年度に（財）日本食品分析センターが再度検討した液体クロマトグラフ質量分析計によるアメトリン、シアナジン及びプロメトリンの残留分析法（以下「センター法」という。）<sup>3)</sup>を基に、低濃度での添加回収試験及び定量下限の検討を行った。

なお、アメトリンは、Ciba Geigy 社（現 Syngenta AG 社）によって開発されたトリアジン系除草剤であり、米国ではサトウキビ、とうもろこし及びパイナップルに使用されている。日本では現在農薬として登録されていない（2005 年に失効）。日本国内での飼料中の残留基準値は設定されていない。

また、プロメトリンは、Geigy 社（現 Syngenta AG 社）により開発されたメチルチオトリアジン系除草剤であり、日本では、豆類、麦類及びとうもろこし等を対象として登録されている。また、米国等でも使用されている。日本国内での飼料中の残留基準値は設定されていない。



Ametryn (2-Ethylamino-4-isopropylamino-6-methylthio-s-triazine)

CAS No.: 834-12-8

C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>S, MW: 227.3

Cyanazine (2-Chloro-4-((1-cyano-1-methylethyl)amino)-6-(ethylamino)-s-triazine)

CAS No.: 21725-46-2

C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>6</sub>, MW: 240.7

Prometryn (Bis(isopropylamino)-6-(methylthio)-s-triazine)

CAS No.: 7287-19-6

C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>S, MW: 241.4

Fig. 1 Chemical structures of ametryn, cyanazine and prometryn

## 2 分析方法

### 2.1 試料

ブロイラー肥育前期用配合飼料，乾牧草（スーダングラスヘイ）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎して用いた。

なお，検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

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

Kind of formula feed	Group of ingredients	Ratio (%)	Ingredients
For starting broiler chick	Grains	57	Corn
	Oil meals	26	Soybean meal
	Animal by-product	10	Fish meal
	Others	7	Animal fat, Alfalfa meal, Calcium carbonate, Calcium phosphate, Salt

### 2.2 試薬

#### 1) シアナジン標準原液

シアナジン [C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>CIN<sub>6</sub>]（関東化学製，純度 98.9%）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線までアセトンを加えてシアナジン標準原液を調製した（この液 1 mL は，シアナジンとして 0.5 mg を含有する．）。

#### 2) アメトリン標準原液

アメトリン [C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>S]（和光純薬工業製，純度 100.0%）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線までアセトンを加えてアメトリン標準原液を調製した（この液 1 mL は，アメトリンとして 0.5 mg を含有する．）。

#### 3) プロメトリン標準原液

プロメトリン [C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>S]（和光純薬工業製，純度 98.9%）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線までアセトンを加えてプロメトリン標準原液を調製した（この液 1 mL は，プロメトリンとして 0.5 mg を含有する．）。

#### 4) 農薬混合標準液

使用に際して，アメトリン標準原液，シアナジン標準原液及びプロメトリン標準原液の一定量を混合し，アセトンで正確に希釈し，1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 及び 100 ng を含有する各農薬混合標準液を調製した。

#### 5) アセトン，ヘキサン，酢酸エチル及びアセトニトリルは残留農薬分析用試薬を用いた。特記している以外の試薬については特級を用いた。

#### 6) ヘキサン飽和アセトニトリル

500 mL の分液漏斗にアセトニトリル 300 mL を入れ，更にヘキサン 50 mL を加えた。5 分間振り混ぜた後静置し，アセトニトリル層（下層）を分取した。

### 2.3 装置及び器具

#### 1) 液体クロマトグラフ質量分析計：Agilent Technologies 製 1100 Series

- 2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2DW
- 3) エバポレーター：BÜCHI 製 R-200
- 4) 高速遠心分離機：久保田製作所製 KM-15200
- 5) 多孔性ケイソウ土カラム：Varian 製 Chem Elut (20 mL 容)
- 6) グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：Supelco 製 Envi-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (500 mg/500 mg)
- 7) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 20 mL (乾牧草は 30 mL) を加えた後 30 分間静置し、アセトン 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さをアセトン 50 mL で洗浄し、洗液をろ液に合わせた。更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。試料溶液 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 2 mL まで減圧濃縮してカラム処理 I に供する試料溶液とした。

### 2) カラム処理 I

多孔性ケイソウ土カラムに試料溶液を負荷し、容器を水 5 mL で洗浄し、洗液をあわせて負荷し、5 分間静置した。200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、ヘキサン-酢酸エチル (17+3) 10 mL で容器を洗浄し、同様に負荷した。更に同様に 2 回繰り返した。ヘキサン-酢酸エチル (17+3) 50 mL をカラムに負荷し、各農薬を溶出させ、液液分配 (配合飼料以外は、液液分配を省略し、カラム処理 II) に供する試料溶液とした。

### 3) 液液分配

試料溶液を 40°C 以下の水浴でほぼ乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固させた。ヘキサン 30 mL を加えて残さを溶解し、この液を 100 mL の分液漏斗に入れた。ヘキサン 2 mL で容器を洗浄し、洗液を分液漏斗に合わせ、同様に 1 回繰り返した。

分液漏斗にヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、5 分間振とうした。アセトニトリル層 (下層) を 200 mL のなす形フラスコに入れ、ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、同様に操作した。アセトニトリル層を先のなす形フラスコに合わせ、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

### 4) カラム処理 II

試料溶液を 40°C 以下の水浴でほぼ乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固させた。ヘキサン 5 mL を加えて残さを溶解した。

グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムを酢酸エチル 5 mL 及びヘキサン 10 mL で洗浄した。

試料溶液をミニカラムに負荷し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。ヘキサン 5 mL で容器を洗浄し、同様に負荷した。更に同様に 1 回繰り返した。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-酢酸エチル (1+1) 5 mL で容器を洗浄し、洗液をカラムに負荷し、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させ各農薬を溶出させた。更に同様に 1

回繰り返した。ヘキサン-酢酸エチル (1+1) 10 mL をミニカラムに加え、同様に溶出させた。試料溶液を 40°C 以下の水浴でほぼ乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固させた。ヘキサン 3 mL をなす形フラスコに加え、残さを溶解し、カラム処理 III に供する試料溶液とした。

#### 5) カラム処理 III

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムをリザーバーに連結しヘキサン 5 mL で洗浄した。試料溶液をリザーバーに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。ヘキサン 3 mL で容器を洗浄し、同様に負荷した。更に同様に 1 回繰り返した。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (17+3) 5 mL で容器を洗浄し、洗液をカラムに負荷し、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させ各農薬を溶出させた。更に同様に 1 回繰り返した。ヘキサン-アセトン (17+3) 10 mL をミニカラムに加え、同様に溶出させた。試料溶液を 40°C 以下の水浴でほぼ乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固させた。アセトニトリル 1 mL をなす形フラスコに加え、残さを溶解し、液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

#### 6) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各混合標準液各 4  $\mu$ L を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、Table 2 の測定条件に従い選択イオン検出 (SIM) クロマトグラムを得た。

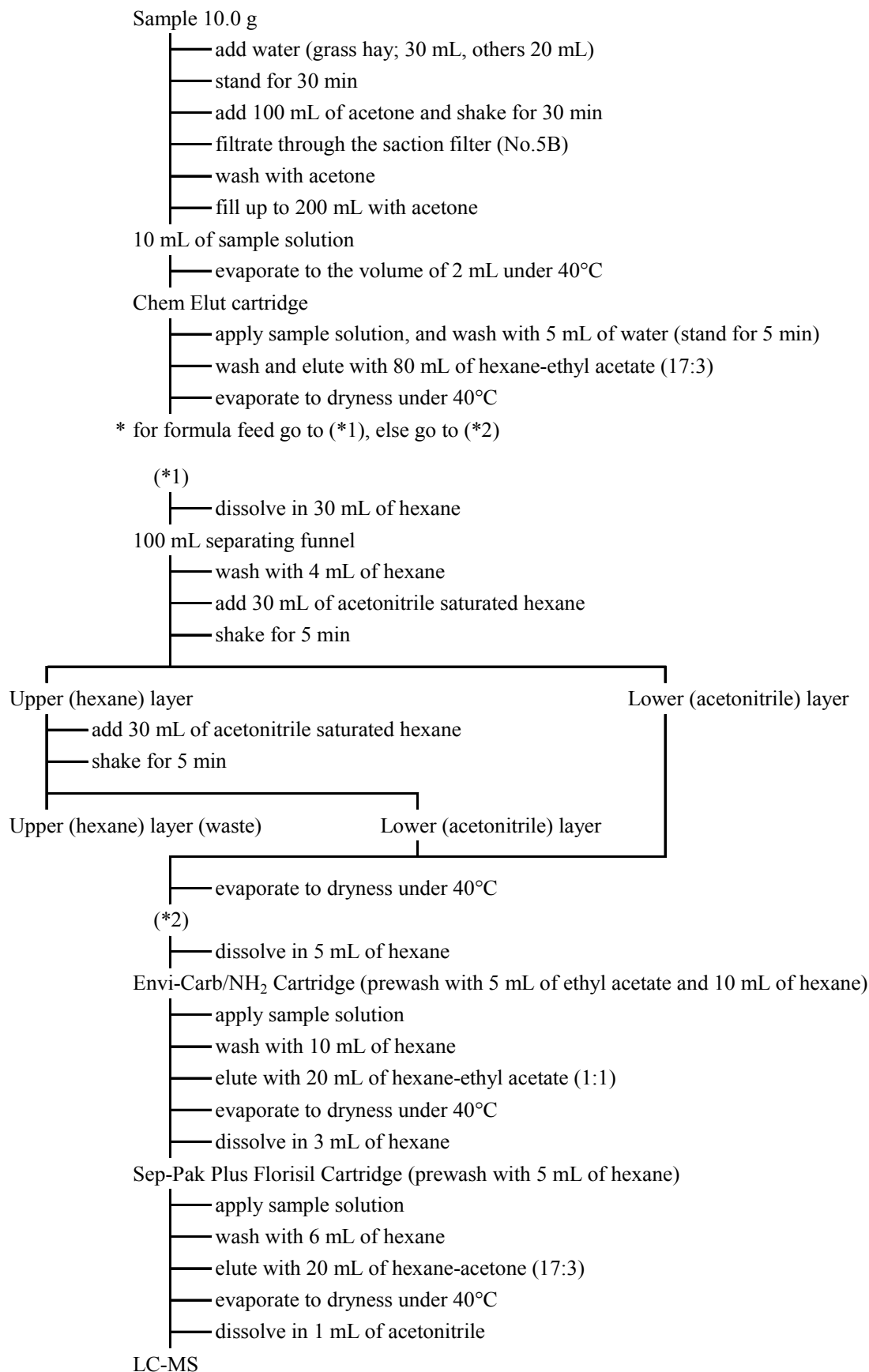
**Table 2 Operating conditions for LC-MS**

Column	GL Sciences Intersil ODS-SP (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 $\mu$ m)
Mobile phase	A: 0.01% formic acid solution B: acetonitrile B(%) 25% (5 min)→2 min→60% (3 min)→2 min→90% (8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temp.	40°C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Fragmentor	120 V
Nebulizer	N <sub>2</sub> (340 kPa)
Drying gas	N <sub>2</sub> (10 L/min, 350°C)
Capillary voltage	4,000 V
Monitor ion	<i>m/z</i> 228 (ametryn), 241 (cyanazine), 242 (prometryn)

#### 7) 計 算

得られた SIM クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のシアナジン量、アメトリン量及びプロメトリン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



**Scheme 1 Analytical procedure for ametryn, cyanazine and prometryn**

### 3 結果及び考察

#### 3.1 液体クロマトグラフ条件の検討

100 ng/mL の農薬混合標準液 4  $\mu$ L をセンター法のとおり液体クロマトグラフ質量分析計で測定したところ、ピークが検出されなかった。溶離液のうち、アセトニトリルの割合を増やしたところ、ピークが検出されたので、最適な溶出条件となるようグラジェントの設定をした。また、目的の農薬が溶出した後にも妨害物質のピークが見られたことから、アセトニトリルの割合が多い部分での洗浄時間を取った。

#### 3.2 検量線

農薬混合標準液を使用して各農薬の検量線を作成した。すべての農薬で 0.5~100 ng/mL の濃度（絶対量として 2~400 pg）で直線性を示した。各農薬の検量線例を Fig. 2-1 から Fig. 2-3 に示した。

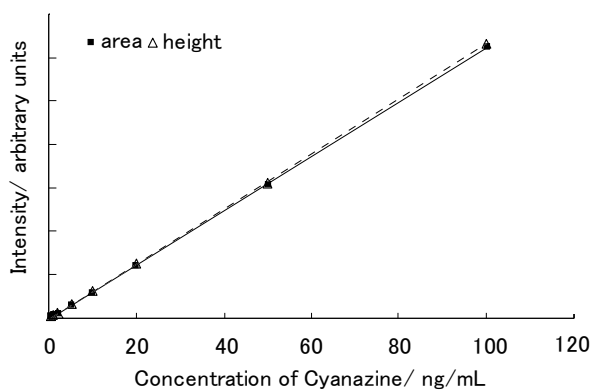


Fig. 2-1 Calibration curve of ametryn

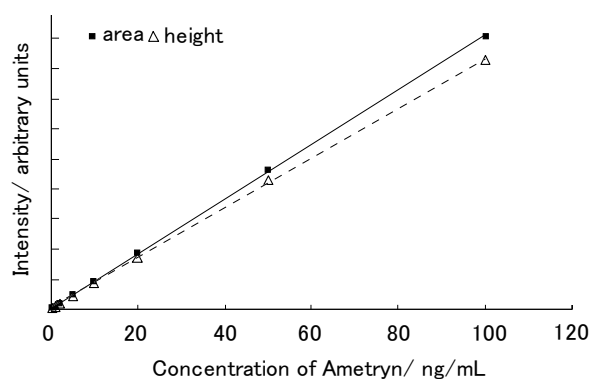


Fig. 2-2 Calibration curve of cyanazine

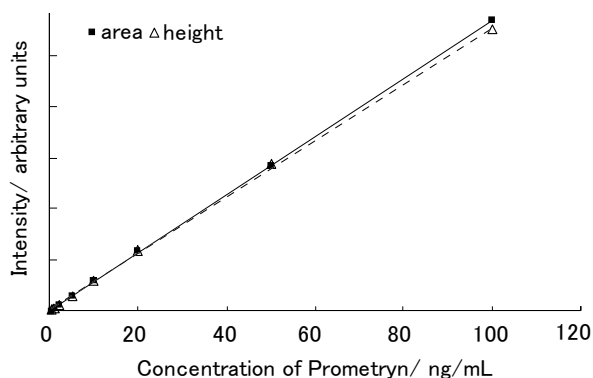


Fig. 2-3 Calibration curve of prometryn

#### 3.3 添加回収試験

ブロイラー肥育前期用配合飼料及び乾牧草（スーダングラスヘイ）にアメトリン、シアナジン及びプロメトリンとして 10  $\mu$ g/kg 及び 100  $\mu$ g/kg 相当量を添加した試料を用いて回収率及び繰返し精度を検討した。その結果、Table 3 のとおりシアナジンで平均回収率 74.7~95.7%，繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 5.4%以下，アメトリンで平均回収率 80.4~93.5%，繰返し精度は RSD として 5.9%以下，プロメトリンで平均回収率 73.8~87.3%，繰返し精度は RSD として 4.0%以下であった。



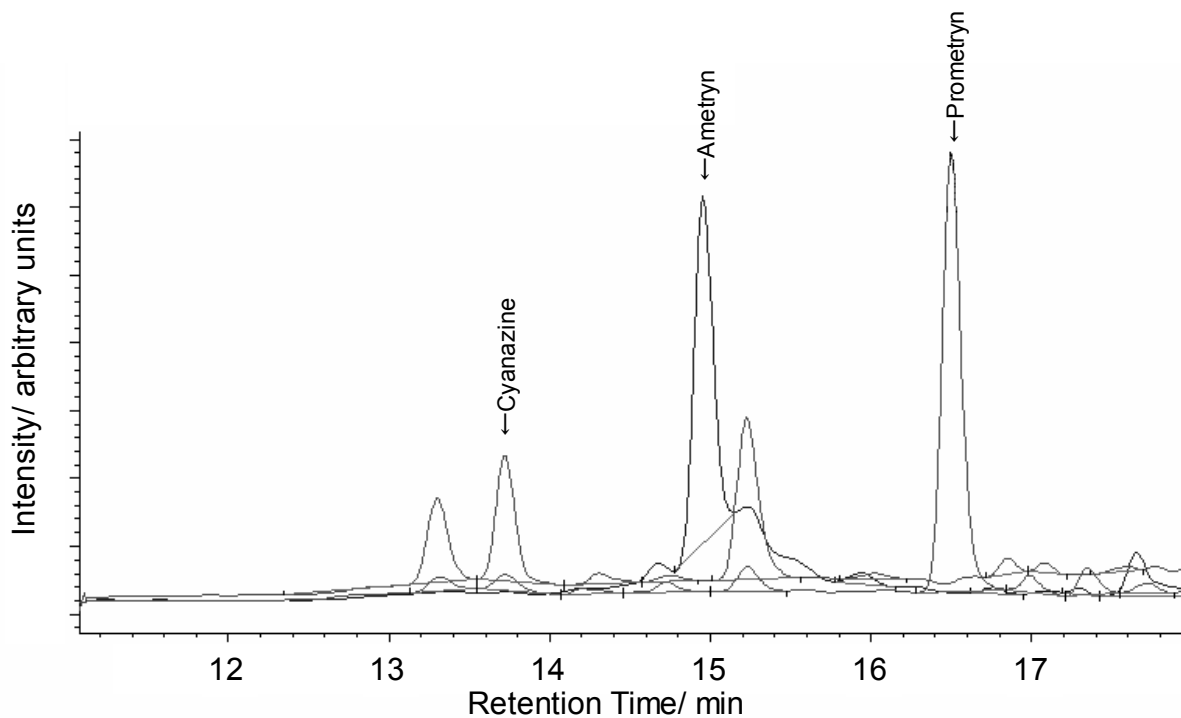
なお、添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

**Table 3 Recovery test of ametryn, cyanazine and prometryn (%)**

Pesticide name	Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Formula feed for starting broiler chick		Sudangrass hay	
		Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
Ametryn	10	81.1	( 4.7 )	80.4	( 5.9 )
	100	93.5	( 0.76)	80.6	( 0.53)
Cyanazine	10	95.7	( 2.9 )	74.7	( 5.4 )
	100	93.6	( 0.72)	85.7	( 2.4 )
Prometryn	10	85.5	( 2.9 )	73.8	( 4.0 )
	100	87.3	( 1.2 )	77.1	( 1.0 )

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation (RSD)



**Fig. 3 SIM chromatogram of ametryn, cyanazine and prometryn**

Sample solution of formula feed for starting broiler chick spiked each pesticide at  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$

#### 3.4 定量下限及び検出下限

本法の定量下限を確認するために、ブロイラー肥育前期用配合飼料及び乾牧草（スーダングラスヘイ）にアメトリン、シアナジン及びプロメトリンをそれぞれ  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  相当量添加した試料について、本法に従って分析し、得られたピークの  $SN$  比を求めた。

その結果、いずれの試料においても、アメトリン、シアナジン及びプロメトリンの3成分すべてについて  $SN$  比が 10 となる濃度はそれぞれ  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  相当量であった。

定量下限を確認するために、ブロイラー前期肥育用配合飼料及び乾牧草（スーダングラス

へイ) にシアナジン, アメトリン及びプロメトリンとして 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用いて回収率及び分析精度を検討した. その結果, Table 4 のとおり平均回収率 77.2~94.5%, 繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 9.4%以下であった.

このため, 本法の定量下限は 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と見積もられた. また, 検出下限は, SN 比が 3 となる濃度から各成分について 0.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と見積もられた.

なお, 定量下限の確認は, ピーク面積及びピーク高さの両方で計算を行ったが, ピーク面積では良好な結果が得られなかった.

**Table 4 Recovery test of ametryn, cyanazine and prometryn (low concentration)**  
(%)

Pesticide name	Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Formula feed for starting broiler chick		Sudangrass hay	
		Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
Ametryn	2	82.9	( 1.8 )	77.2	( 4.4 )
Cyanazine	2	89.5	( 9.4 )	79.2	( 5.4 )
Prometryn	2	94.5	( 6.6 )	87.2	( 3.1 )

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation (RSD)

### 3.5 共同試験

本法の再現精度を調査するため, 共通試料による共同試験を実施した.

配合飼料 (ブロイラー肥育前期用) 及び乾牧草 (スーダングラスヘイ) にアメトリン, シアナジン及びプロメトリンとしてそれぞれ 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した共通試料を用いて, アジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンター, 株式会社島津製作所東京アプリケーション開発センター, 財団法人日本食品分析センター多摩研究所, 社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター, 全国酪農業協同組合連合会分析センター, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター規格検査部, 同肥飼料安全検査部, 同神戸センター消費技術部及び同神戸センター大阪事務所 (9 試験室) において本法に従って共同試験を実施した.

アメトリンの結果は Table 5 のとおり, 配合飼料中のアメトリンの平均回収率は 98.4%, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 4.3%及び 6.2%であり, HorRat は 0.28 であった.

また, 乾牧草中のアメトリンの平均回収率は 92.2%, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 4.2%及び 15%であり, HorRat は 0.66 であった.

シアナジンの結果は Table 6 のとおり, 配合飼料中のシアナジンの平均回収率は 98.9%, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 6.6%及び 9.4%であり, HorRat は 0.43 であった.

また, 乾牧草中のシアナジンの平均回収率は 94.4%, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 4.1%及び 17%であり, HorRat は 0.76 であった.

プロメトリンの結果は Table 7 のとおり, 配合飼料中のプロメトリンの平均回収率は 93.6%, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 2.7%

及び 6.1%であり、HorRat は 0.28 であった。

また、乾牧草中のプロメトリンの平均回収率は 89.6%、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 3.2%及び 11%であり、HorRat は 0.52 であった。

いずれの試料及び分析成分においても HorRat が比較的 low であり、特に配合飼料では 0.5 を下回っていたが、特に本分析法の手順及び共同試験の要領に異常があったとは考えられなかった。

参考のため、各試験室で使用した液体クロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 8 に示した。

**Table 5 Collaborative study results of ametryn**

Lab. No.	(µg/kg)			
	Sample			
	Formula feed		Sudangrass hay	
1	9.70	9.59	8.79	8.01
2	9.00	9.44	9.16	9.72
3	9.89	9.58	8.94	9.13
4	10.7	10.3	9.54	9.84
5	10.4	10.4	9.89	9.73
6	10.6	9.51	7.24	8.51
7	9.82	9.57	9.17	9.35
8	8.78	9.15	7.46	7.52
9	9.70	10.9	12.0	12.0
Spiked level	10.0		10.0	
Determined value <sup>a)</sup>	9.84		9.22	
Recovery (%)	98.4		92.2	
$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	4.3		4.2	
$RSD_R$ <sup>c)</sup> (%)	6.2		15	
HorRat	0.28		0.66	

a) Mean value ( $n=18$ )

b) Repeatability relative standard deviation within same laboratory

c) Reproducibility relative standard deviation

**Table 6 Collaborative study results of cyanazine**

Lab. No.	Sample (µg/kg)			
	Formula feed		Sudangrass hay	
	1	10.1	9.09	8.30
2	8.60	9.28	7.60	7.56
3	9.45	9.06	8.50	8.04
4	10.8	10.7	9.67	10.1
5	9.46	9.84	8.31	7.83
6	9.57	8.56	9.66	9.12
7	10.9	10.3	10.7	11.0
8	10.5	9.22	11.9	11.2
9	10.4	12.1	11.8	11.0
Spiked level	10.0		10.0	
Determined value <sup>a)</sup>	9.89		9.44	
Recovery (%)	98.9		94.4	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	6.6		4.1	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	9.4		17	
HorRat	0.43		0.76	

a) Mean value ( $n=18$ )

b) Repeatability relative standard deviation within same laboratory

c) Reproducibility relative standard deviation

**Table 7 Collaborative study results of prometryn**

Lab. No.	Sample (µg/kg)			
	Formula feed		Sudangrass hay	
	1	9.43	9.31	8.97
2	9.00	9.52	8.80	9.16
3	10.2	9.64	8.73	9.15
4	10.1	10.2	10.1	10.2
5	9.58	9.32	9.08	9.11
6	8.84	8.30	7.52	7.36
7	9.37	9.36	9.20	9.26
8	8.73	8.35	7.38	8.02
9	9.49	9.77	10.4	10.7
Spiked level	10.0		10.0	
Determined value <sup>a)</sup>	9.36		8.96	
Recovery (%)	93.6		89.6	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	2.7		3.2	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	6.1		11	
HorRat	0.28		0.52	

a) Mean value ( $n=18$ )

b) Repeatability relative standard deviation within same laboratory

c) Reproducibility relative standard deviation

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

Lab. No.	LC-MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Agilent Technologies Agilent 1100 Series LC MSD	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: Agilent Technologies Agilent 1200 Series MS: Agilent Technologies Agilent 6410 QQQ	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	Shimadzu LCMS-2010EV	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	LC: Waters alliance 2695 MS: Waters micromass Quattro micro	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	Shimadzu LCMS-2010EV	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
6	Agilent Technologies Agilent 6410	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
7	Shimadzu LCMS-2010EV	Shimadzu Shim-pack XR-ODS (2.0 mm×100 mm, 2.2 μm)
8	Agilent Technologies 1100 Series MSD VL	Kanto Chemical Mightysil RP-18GP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
9	LC: Waters 2795 MS: Waters Quattro Premier XE	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)

#### 4 まとめ

財団法人日本食品分析センターが開発した液体クロマトグラフ質量分析計によるアメトリン、シアナジン及びプロメトリンの残留分析法を検討した。

- 1) センター法での液体クロマトグラフのグラジェント条件では、ピークが認められなかったことから、グラジェントの設定を変更した。
- 2) 各農薬の検量線を作成したところ、すべての農薬で 0.5~100 ng/mL の濃度（絶対量として 2~400 pg）で直線性を示した。
- 3) シアナジン、アメトリン及びプロメトリンをブロイラー肥育前期用配合飼料及び乾牧草（スーダングラス）に 10 μg/kg 相当量及び 100 μg/kg 相当量添加し、添加回収試験を実施した結果、アメトリンで平均回収率 80.4~93.5%、繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 5.9%以下、シアナジンで平均回収率 74.7~95.7%、繰返し精度は RSD として 5.4%以下、プロメトリンで平均回収率 73.8~87.3%、繰返し精度は RSD として 4.0%以下の成績が得られた。
- 4) 本法の定量下限等を確認するため、シアナジン、アメトリン及びプロメトリンをブロイラー肥育前期用配合飼料及び乾牧草（スーダングラスヘイ）にそれぞれ 2 μg/kg 相当量添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 77.2~94.5%、繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 9.4%以下の成績が得られた。本法の定量下限は各農薬として 2 μg/kg、検出下限は各農薬として 0.7 μg/kg と見積もられた。
- 5) 配合飼料（ブロイラー肥育前期用）及び乾牧草（スーダングラスヘイ）にアメトリン、シアナジン及びプロメトリンとしてそれぞれ 10 μg/kg 相当量を添加した共通試料を用いて、9 試験室において本法に従って共同試験を実施した。

その結果、配合飼料中のアメトリンの平均回収率は 98.4%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $RSD_r$  及び  $RSD_R$ ) として 4.3%及び 6.2%であり、HorRat は 0.28 であった。また、乾牧草中のアメトリンの平均回収率は 92.2%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 4.2%及び 15%であり、HorRat は 0.66 であった。

配合飼料中のシアナジンの平均回収率は 98.9%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $RSD_r$  及び  $RSD_R$ ) として 6.6%及び 9.4%であり、HorRat は 0.43 であった。また、乾牧草中のシアナジンの平均回収率は 94.4%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 4.1%及び 17%であり、HorRat は 0.76 であった。

配合飼料中のプロメトリンの平均回収率は 93.6%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $RSD_r$  及び  $RSD_R$ ) として 2.7%及び 6.1%であり、HorRat は 0.28 であった。また、乾牧草中のプロメトリンの平均回収率は 89.6%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 3.2%及び 11%であり、HorRat は 0.52 であった。

## 謝 辞

共同試験に参加していただいたアジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンター、株式会社島津製作所東京アプリケーション開発センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、全国酪農業協同組合連合会分析センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析法の一部改正について”，平成 16 年 11 月 26 日，16 消安第 5298 号 (2004).
- 2) 財団法人日本食品分析センター：平成 16 年度 飼料の有害物質等残留基準設定等委託事業（分析法の開発） 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2005).
- 3) 財団法人日本食品分析センター：平成 18 年度 飼料の有害物質等残留基準設定等委託事業（分析法の開発） 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2007).

## 4 飼料中のジクロロボス及びナレドのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

杉本 泰俊<sup>\*1</sup>, 八木 寿治<sup>\*2</sup>, 加藤 隆久<sup>\*2</sup>, 伊藤 潤<sup>\*2</sup>, 三井 由紀子<sup>\*2</sup>, 白井 小枝<sup>\*2</sup>

### Determination of Dichlorvos and Naled in Feeds by GC-MS

Yasutoshi SUGIMOTO<sup>\*1</sup>, Toshiharu YAGI<sup>\*2</sup>, Takahisa KATOU<sup>\*2</sup>, Jun ITOU<sup>\*2</sup>,  
Yukiko MITSUI<sup>\*2</sup> and Sae SHIRAI<sup>\*2</sup>

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

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

An analytical method for determination of dichlorvos and naled in feeds using gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) was developed. This analysis was conducted under shaded conditions. After the addition of 15 mL of 1 mol/L hydrochloric acid, the samples were left still for 15 minutes. Dichlorvos and naled were extracted with 50 mL (150 mL for grass hay) of acetone and filtered. The extracts were filled up to 150 mL (200 mL for grass hay). 20 mL (4 mL for grass hay) of the sample solution was condensed and purified by Chem Elut cartridge with 80 mL of hexane and condensed again. Naled was converted into dichlorvos, by adding 30 mL of phosphoric acid buffer, 4 mL of cysteine solution and 5 g of sodium chloride into the condensed solution and shaking them together for five minutes. This solution was subjected to the same operation again, and dehydrated with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydrate and dried after filtration through filter paper (No.5B) and dissolved in 5 mL of hexane-diethyl ether (17:3), and purified with Sep-Pak Plus Silica cartridge and eluted with 20 mL of hexane-acetone (19:1), and dried again. The residue was dissolved in 2 mL of acetone, 1 ml of which was injected to GC-MS on capillary column (TR-5MS; 5% Phenyl (equiv) polysilphenylene-siloxane, 0.25 mm i.d.×30 m, film thickness: 0.25 μm) for determination of dichlorvos. A recovery test was conducted using two kinds of formula feed, corn and bermuda grass hay spiked with 10,000, 1,000, 200 and 40 μg/kg of dichlorvos and naled. The mean recoveries of dichlorvos and naled were 73.2%~102% and 73.5%~93.2%, and the relative standard deviations (RSD) were within 17% and 14% respectively. A collaborative study was conducted in ten laboratories using corn and alfalfa hay spiked with naled at 200 and 10,000 μg/kg. The mean quantitative value of corn was 108 μg/kg (92.7%), repeatability and reproducibility as the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) were 4.3% and 12% respectively, and HorRat was 0.54. As for alfalfa hay, these values were 4,820 μg/kg (83.1%), 4.1%, 12% and 0.96, respectively.

Key words: 残留農薬 pesticide residue ; 有機リン系殺虫剤 organophosphorus insecticide ;  
ジクロロボス dichlorvos ; ナレド naled ; ガスクロマトグラフ質量分析計 gas  
chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) ; 飼料 feed; 共同試験 collaborative study

<sup>\*1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター, 現 同福岡センター

<sup>\*2</sup> (独) 農林水産消費安全技術センター名古屋センター

## 1 緒 言

ジクロロボス (Fig. 1) は Bayer 社が開発した有機リン系殺虫剤で、トリクロロホン (DEP) 剤中の共存物として発見され、DEP が脱塩酸してジクロロボスとなる。残効性が短く、収穫間近まで使用できる長所があり、生食用野菜、茶、クワ等の害虫防除に使用される。なお、その作用機構はコリンエステラーゼ阻害である<sup>1)</sup>。

ナレド (Fig. 1) は Chevron Chemical 社が開発した臭素と塩素を含む有機リン系殺虫剤である。ジクロロボスと同様に残効性が短く、生食用野菜等に使用されるが、その活性は Fig. 1 に示すとおり、ナレドから臭素原子が脱離したジクロロボスによるものである<sup>1)</sup>。

飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令 (昭和 51 年農林省令第 35 号) が平成 18 年 5 月 29 日付けで改正され、ジクロロボス及びナレドの総和で残留基準値 (えん麦, 大麦, 小麦, とうもろこし, マイロ及びライ麦で 0.2 ppm, 牧草で 10 ppm) が設定された。

現在、飼料分析基準<sup>2)</sup>には、ナレドの定量法は収載されておらず、定量法の確立が急務となっている。財団法人日本食品分析センターが検討したガスクロマトグラフィーによるジクロロボス及びナレドの飼料中の残留農薬分析法<sup>1)</sup>の前処理操作を参考に、測定方法としてガスクロマトグラフ質量分析計を用いた定量法を検討したところ、良好な成績が得られたので報告する。

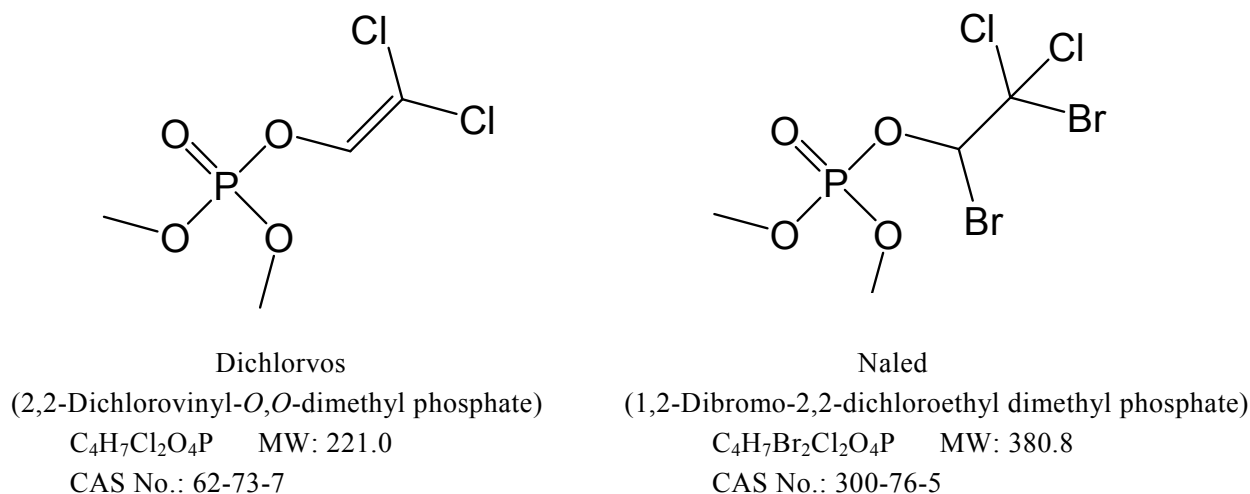


Fig. 1 Chemical structures of dichlorvos and naled

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

市販の配合飼料 (成鶏飼育用, 肉豚肥育用, 肉用牛肥育用), 飼料原料 (とうもろこし, 大麦, マイロ), 乾牧草 (スーダングラスヘイ, パミューダグラスヘイ, アルファルファヘイ, チモシーヘイ) をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し, 供試試料とした。

なお, 検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。



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

Kind of formula feed	Group of ingredients	Ratio (%)	Ingredients
For layer	Grains	54	Corn, Polished rice
	Oil meals	20	Soybean meal, Corn germ meal Rapeseed meal, Corn gluten meal
	Brans	11	Corn gluten feed, Wheat bran Corn dried distillers grains with solubles
	Animal by-products	3	Fish meal, Meat and bone meal (derived from pork and poultry)
	Others	12	Calcium carbonate, Animal fat, Salt Paprika extract, Silicic anhydride, Feed additive
For growing pig	Grains	74	Corn, Milo, Wheat flour, Bread crumbs, Dextrin
	Oil meals	15	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn germ meal
	Brans	5	Corn gluten feed, Rice bran
	Animal by-products	2	Fish meal
	Others	4	Animal fat, Calcium carbonate, Salt, Yucca extract, Quillaia extract, Betaine, Vermiculite, Vegetable Oil, Silicic acid, Corn steep liquor, Glucose, Dextran fermentation by-production concentrated liquid, Calcium phosphate, Feed additive
For finishing beef cattle	Grains	69	Corn, Barley, Wheat
	Brans	23	Wheat bran, Soybean hulls
	Oil meals	7	Soybean meal
	Others	1	Molasses, Salt, Calcium carbonate

## 2.2 試 薬

### 1) ジクロロボス標準液

ジクロロボス [C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P] 標準品 (関東化学製, 純度 99.0%) 25 mg を正確に量って 50 mL の褐色全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてジクロロボス標準原液を調製した (この液 1 mL はジクロロボス 0.5 mg を含有する.) .

使用に際して, ジクロロボス標準原液の一定量をアセトンで正確に希釈し, 1 mL 中にジクロロボスとしてそれぞれ 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1 及び 2 µg を含有する各ジクロロボス標準液を調製した.

### 2) ナレド標準液

ナレド [C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>Br<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P] 標準品 (和光純薬工業製, 純度 99.1%) 25 mg を正確に量って 50 mL の褐色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ナレド標準原液を調製した (この液 1 mL はナレド 0.5 mg を含有する.) .

使用に際して, ナレド標準原液の一定量をアセトンで正確に希釈し, 1 mL 中にナレドとしてそれぞれ 2, 4, 20 及び 50 µg を含有する各ナレド標準液を調製した.

### 3) リン酸緩衝液

リン酸二水素ナトリウム二水和物 7.8 g を水 500 mL に溶かした溶液 230 mL に, リン酸水素二ナトリウム・12 水 17.9 g を水 500 mL に溶かした溶液を加え, 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶

液で pH 7.2 に調整した。

4) システイン溶液

L-システイン塩酸塩一水和物 4 g を水 50 mL に溶かし、2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.0 に調整した。

5) アセトン、ヘキサン、ジエチルエーテル及び硫酸ナトリウム（無水）は、残留農薬分析用を用いた。その他の試薬については特級を用いた。

### 2.3 装置及び器具

1) ガスクロマトグラフ：Thermo Electron 製 FOCUS GC

2) 質量分析計：Thermo Electron 製 POLARIS Q

3) 振とう機：タイテック製 SR-2w

4) エバポレーター：東京理化学器械製 N-1000

5) 多孔性ケイソウ土カラム：Varian 製 EXTUBE Extraction Columns Chem Elut CE 1020 (20 mL 容)

6) シリカゲルカートリッジ：Waters 製 Sep-Pak Plus Silica Cartridge (充てん剤量 690 mg)

### 2.4 定量方法

本法は遮光した状態で行った。

1) 抽出

試料 10.0 g を量って 200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、1 mol/L 塩酸 15 mL を加え 15 分間静置した。アセトンを 50 mL（乾牧草は 150 mL）加え、30 分間振り混ぜて抽出した。100 mL の褐色全量フラスコ（乾牧草は 200 mL の褐色全量フラスコ）をブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後、容器及び残さをアセトン 30 mL で洗浄し、吸引ろ過し、褐色全量フラスコの標線までアセトンを加えた。定容した抽出液 20 mL（乾牧草は 4 mL）を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40°C 以下の水浴で 2 mL 以下まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

2) カラム処理 I

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに入れ、容器を水 5 mL で洗浄し、洗液をカラムに加え、10 分間静置した。200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液を入れた容器をヘキサン 10 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、ジクロロボス及びナレドを溶出させた。ヘキサン 50 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40°C 以下の水浴で 40 mL 以下まで減圧濃縮し、ジクロロボスへの変換に供する試料溶液とした。

3) ジクロロボスへの変換

試料溶液を 200 mL の分液漏斗 A に入れ、容器をリン酸緩衝液 30 mL で洗浄し分液漏斗 A に合わせた。システイン溶液 4 mL 及び塩化ナトリウム 5 g を分液漏斗 A に加え、5 分間振とうし、ナレドをジクロロボスに変換した。水層（下層）を 200 mL の分液漏斗 B に入れ、ヘキサン層を 200 mL の三角フラスコに分取した。分液漏斗 B にヘキサン 40 mL を加え、同様に操作し、水層を捨て、ヘキサン層を三角フラスコに合わせた。三角フラスコに硫酸ナトリウム（無水）適量を加えヘキサン層を脱水した後、200 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ヘキサンで洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせた。アセトン-ジエチレングリコール (49+1) 0.5 mL を加え、40°C 以下の水浴で 1 mL 以

下まで減圧濃縮し，窒素ガスを送って乾固した．ヘキサンジエチルエーテル (17+3) 5 mL を加え，カラム処理 II に供する試料溶液とした．

#### 4) カラム処理 II

シリカゲルカートリッジを注射筒に連結し，ヘキサンジエチルエーテル (17+3) 5 mL で洗浄した．試料溶液を注射筒に入れ，液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた．ヘキサンジエチルエーテル (17+3) 5 mL ずつで 3 回容器を洗浄し，洗液を順次カラムに加え，液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた．50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き，ヘキサノンアセトン (19+1) 20 mL をカラムに加えてジクロロボスを溶出させた．

溶出液にアセトンジエチレングリコール (49+1) 0.5 mL を加え，40°C 以下の水浴で 1 mL 以下まで減圧濃縮した後，窒素ガスを送って乾固した．

アセトン 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし，ガスクロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした．

#### 5) ガスクロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各ジクロロボス標準液各 1  $\mu$ L をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し，選択イオン検出 (SIM) クロマトグラムを得た．

#### 6) 計 算

得られた SIM クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し，試料中のジクロロボス (ナレドをジクロロボスに変換したものを含む．) の量を算出した．なお，ナレド量に換算する場合は，測定されたジクロロボス量に係数 1.72 (ナレド分子量 : 380.8 / ジクロロボス分子量 : 221.0) を乗じて求めた．

なお，定量法の概要を Scheme 1 に，ガスクロマトグラフ質量分析計の測定条件を Table 2 に示した．

Under the shaded light condition

Sample 10 g (brown erlenmeyer flask of 200 mL)

- add 15 mL of 1 mol/L HCl solution
- allow to stand for 15 min
- add 50 mL of acetone (grass hay: 150 mL)
- shake for 30 min
- filtrate under suction filter (No. 5B)
- wash with 30 mL of acetone
- fill up to 100 mL (grass hay: 200 mL)

20 mL of sample solution (grass hay: 4 mL)

- evaporate to the volume of 2 mL under 40°C

Chem Elut cartridge

- apply sample solution and wash with 5 mL of water
- allow to stand for 10 min
- wash and elute with 10 mL of hexane (three times)
- elute with 50 mL of hexane
- evaporate to the volume of 40 mL under 40°C

200mL separating funnel A

- wash with 30 mL of phosphoric buffer solution
- add 4 mL of cysteine solution and 5 g of NaCl
- shake for 30 minutes and convert naled into dichlorvos

Hexane layer (upper layer)

Water layer (lower layer)

200 mL separating funnel B

— add 40 mL of hexane

— shake for 5 min

Hexane layer (upper layer)

Water layer (lower layer) (waste)

- dehydrate with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydride
- filtrate through filter paper (No. 5B)
- add 0.5 mL of diethylene glycol-acetone (1:49)
- evaporate to dryness under 40°C
- dissolve in 5 mL of hexane-diethyl ether (17:3)

Sep-Pak Plus Silica (prewash with 5 mL of hexane-diethyl ether (17:3))

- apply sample solution
- wash with 5 mL of hexane-diethyl ether (17:3) (three times)
- elute with 20 mL of hexane-acetone (19:1)
- add 0.5 mL of diethylene glycol-acetone (1:49)
- evaporate to dryness under 40°C
- dissolve in 2 mL of acetone

GC-MS 1 µL

**Scheme 1 Analytical procedure for dichlorvos and naled in feeds by using GC-MS**

**Table 2      Operating conditions for GC-MS**

Column	TR-5MS (0.25 mm i.d.×30 m; 0.25 µm film thickness)
Column temp.	60°C (1 min)→15°C/min→280°C (5 min)
Injection mode	Splitless
Injector temp.	250°C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temp.	280°C
Ion source temp.	230°C
Ionization	Electron impact
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	<i>m/z</i> 185 (quantitation), 109 (confirmation)

### 3 結果及び考察

#### 3.1 安定性

ナレドは光分解を受けやすいとの知見が得られている<sup>3)</sup>ことから、本法は遮光条件で実施することとした。

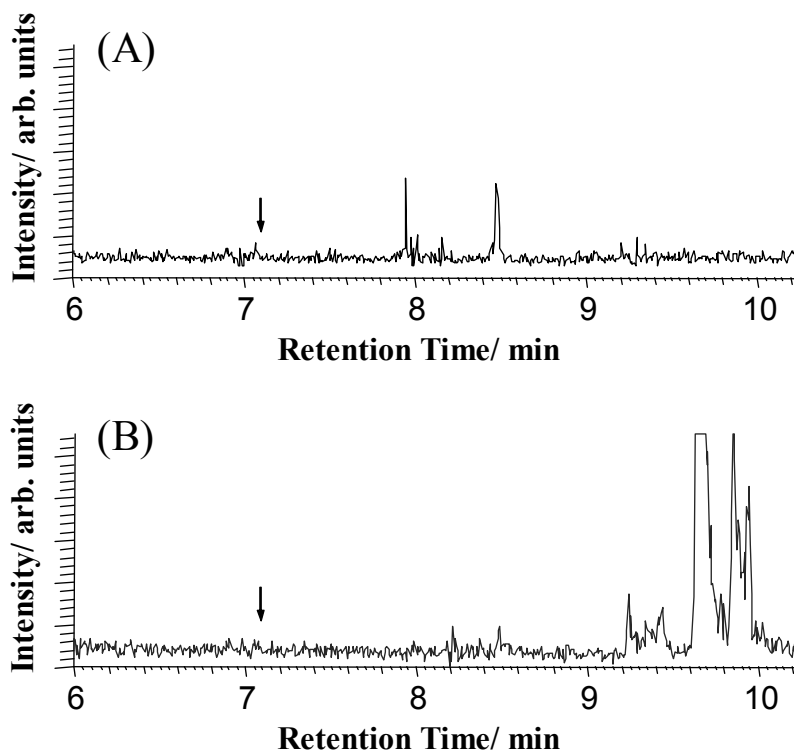
#### 3.2 検量線

ジクロールボスとして 1 mL 中に 10~2,000 ng を含む各標準液を調製し、各 1 µL をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、得られた SIM クロマトグラムピークの面積及び高さを求めて検量線を作成した。その結果、検量線はジクロールボスとして 0.01~2 ng の範囲で直線性を示した。

#### 3.3 妨害物質の検討

3 種類の配合飼料（成鶏飼育用、肉豚肥育用、肉用牛肥育用）、4 種類の乾牧草（スーダングラスヘイ、バミューダグラスヘイ、アルファルファヘイ、チモシーヘイ）及び 3 種類の穀類（とうもろこし、大麦、マイロ）について、本法に従って SIM クロマトグラムを作成し、ジクロールボスの定量を妨害するピークの有無を検討した。その結果、ジクロールボスの定量を妨害するピークは認められなかった。

なお、妨害物質の検討で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。



**Fig. 2 SIM Chromatograms of each sample solution**

(A) Sample solution of formula feed for layer

(B) Sample solution of corn

(↓: Retention time of dichlorvos)

### 3.4 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した。

Table 1 の成鶏飼育用配合飼料，肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしにジクロロボス又はナレドとしてそれぞれ 200 及び 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量添加した試料並びにバキューダグラスヘイにジクロロボス又はナレドとしてそれぞれ 10,000 及び 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量添加した試料を用いて，本法に従って 3 回併行分析を行い，その回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果，Table 3 及び 4 のとおり，ジクロロボスの平均回収率は 73.2%~102%，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 17%以下，ナレドの平均回収率は 73.5%~93.2%，その繰返し精度は RSD として 14%以下であった。

なお，添加回収試験で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

**Table 3 Results of recovery test for dichlorvos**

Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Formula feed for layer		Formula feed for beef cattle		Corn		Bermudagrass hay	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
	10,000	---	---	---	---	---	---	84.1
1,000	---	---	---	---	---	---	73.2	( 2.3)
200	99.1	( 4.3)	94.1	( 2.5)	96.7	(17 )	---	---
40	85.4	(11 )	102	(16 )	93.4	(11 )	---	---

a) Mean recovery ( $n=3$ )

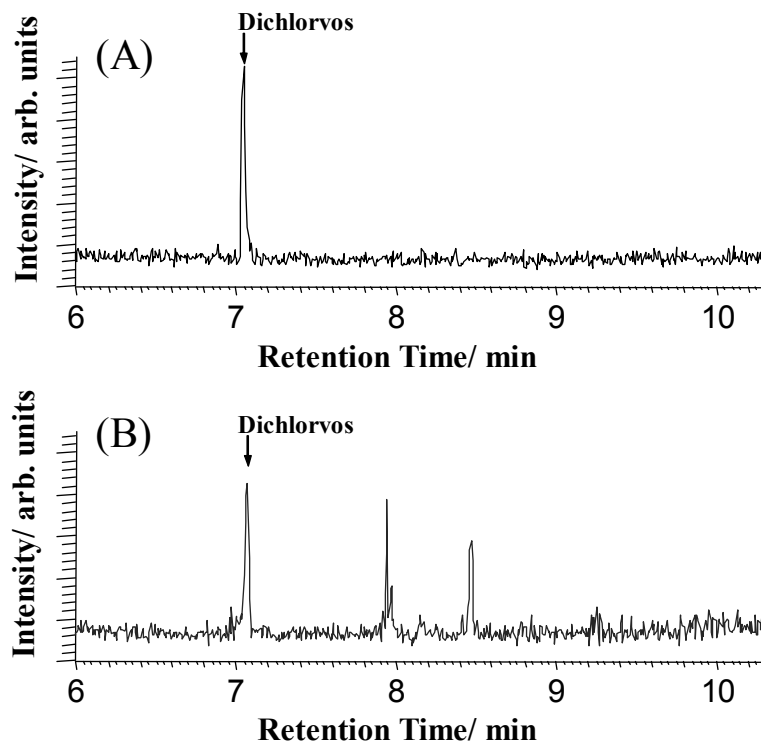
b) Relative standard deviation (RSD)

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

Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Formula feed for layer		Formula feed for beef cattle		Corn		Bermudagrass hay	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
	10,000	---	---	---	---	---	---	76.3
1,000	---	---	---	---	---	---	77.2	( 6.7)
200	73.5	( 3.2)	86.7	( 3.2)	75.7	( 3.4)	---	---
40	83.6	(12 )	93.2	(12 )	87.9	(14 )	---	---

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation (RSD)

**Fig. 3 SIM chromatograms of standard solution and sample solution**

(A) Dichlorvos standard solution (100 ng/mL)

(B) Sample solution of formula feed for layer (spiked with naled at 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

### 3.5 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしにジクロロボスを添加した試料のSIMクロマトグラムについて得られたピークのSN比を求めた。ジクロロボスのピークのSN比が10になる濃度を定量下限、ピークのSN比が3になる濃度を検出下限としたところ、両試料とも、本法の定量下限は20 µg/kg（ナレドに由来する場合は、ナレドに換算して40 µg/kg相当量）、検出下限は7 µg/kg（同10 µg/kg相当量）程度と推定された。

参考までに、成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしにジクロロボス及びナレドとしてそれぞれ40及び20 µg/kg相当量添加した試料について3点併行分析を実施したところ、その平均回収率及び繰返し精度はTable 5及び6のとおりであった。

**Table 5 Results of recovery test at the concentration of determination limit for dichlorvos**

Spiked level (µg/kg)	Formula feed for layer		Corn	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
40	85.4	(11 )	93.4	(11 )
20	114	(24 )	70.2	(23 )

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation (RSD)

**Table 6 Results of recovery test at the concentration of determination limit for naled**

Spiked level (µg/kg)	Formula feed for layer		Corn	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
40	83.6	(12 )	87.9	(14 )
20	130	(14 )	95.2	(21 )

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation (RSD)

### 3.6 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

とうもろこしにナレドとして200 µg/kg相当量（ジクロロボスとして116 µg/kg相当量）、アルファルファヘイにナレドとして10,000 µg/kg相当量（ジクロロボスとして5,800 µg/kg相当量）を添加した試料を用い、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、財団法人マイコトキシン検査協会、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、全国酪農業協同組合連合会分析センター、アジレント・テクノロジー株式会社八王子事業所、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同名古屋センター、同神戸センター大阪事務所及び同福岡センターの10試験室で共同分析を実施した。

その結果はTable 7のとおり、とうもろこしの平均回収率は92.7%、その繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（RSD<sub>r</sub>及びRSD<sub>R</sub>）として4.3%及び12%であり、HorRatは0.54であった。



また、アルファルファヘイの平均回収率は 83.1%，その繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$  及び  $RSD_R$ ) として 4.1% 及び 12% であり，HorRat は 0.96 であった。

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

**Table 7 Collaborative study results of naled**

Lab. No.	Sample (µg/kg as dichlorvos)			
	Corn		Alfalfa hay	
1	108	99	5,040	5,010
2	122	128	5,520	5,810
3	100	108	4,630	5,240
4	106	111	4,330	4,060
5	133 <sup>d)</sup>	91 <sup>d)</sup>	4,520 <sup>e)</sup>	2,850 <sup>e)</sup>
6	88	85	3,930	4,180
7	107	109	4,440	4,150
8	104	102	5,450	5,380
9	122	133	5,140	5,190
10	99	105	4,560	4,610
Spiked level	116		5,800	
Mean value <sup>a)</sup>	108		4,820	
Recovery (%)	92.7		83.1	
$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	4.3		4.1	
$RSD_R$ <sup>c)</sup> (%)	12		12	
HorRat	0.54		0.96	

a)  $n=18$  (without Lab. No. 5)

b) Relative standard deviation of repeatability within same laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

d) Excluded by the Cochran Test

e) Excluded by the single Grubbs Test

Table 8 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	Column (i.d.×length, film thickness)
1	GC: Agilent Technologies 6890 MS: Agilent Technologies 5973	Agilent Technologies DB-5MS (0.25mm i.d.×30 mm, 0.25 μm)
2	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5973	Agilent Technologies HP-5MS (0.25mm i.d.×30 mm, 0.25 μm)
3	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5973inert	Agilent Technologies HP-5MSI (0.25mm i.d.×30 mm, 0.25 μm)
4	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5975B	Agilent Technologies DB-5MS (0.25mm i.d.×30 mm, 0.25 μm)
5	GC: Agilent Technologies 7890 MS: Agilent Technologies 5975	Agilent Technologies DB-5MS (0.25mm i.d.×30 mm, 0.25 μm)
6	Shimadzu GCMS-QP2010 Plus	Restek RTX-5MS (0.25mm i.d.×30 mm, 0.25 μm)
7	Shimadzu GCMS-QP2010	Restek RTX-5MS (0.25mm i.d.×30 mm, 0.25 μm)
8	GC: Thermo Electron FOCUS GC MS: Thermo Electron POLARIS-Q	Thermo Electron TR-5MS (0.25mm i.d.×30 mm, 0.25 μm)
9	Shimadzu GCMS-QP2010	Restek RTX-5MS (0.25mm i.d.×30 mm, 0.25 μm)
10	Shimadzu GCMS-QP2010	Agilent Technologies HP-5MS (0.25mm i.d.×30 mm, 0.25 μm)

#### 4 まとめ

飼料中のジクロロボス及びナレドのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法について検討したところ、次の結果を得た。

- 1) 検量線は 0.01~2 ng の範囲で直線性を示した。
- 2) 3 種類の配合飼料, 4 種類の乾牧草及び 3 種類の穀類について, 本法に従って SIM クロマトグラムを作成したところ, ジクロロボスの定量を妨害するピークは認められなかった。
- 3) 2 種類の配合飼料及び 2 種類の飼料原料にジクロロボス及びナレドをそれぞれ 10,000, 1,000, 200 及び 40 μg/kg 相当量を添加し, 本法に従って添加回収試験を実施した結果, ジクロロボスの平均回収率は 73.2%~102%, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 17%以下, ナレドの平均回収率は 73.5%~93.2%, その繰返し精度は RSD として 14%以下であった。
- 4) 本法によるジクロロボスの定量下限は試料中で 20 μg/kg (ナレドに由来する場合は, ナレドに換算して 40 μg/kg 相当量), 検出下限は 7 μg/kg (同 10 μg/kg 相当量) と推定された。
- 5) とうもろこし及びアルファルファヘイにナレドとしてそれぞれ 10,000 μg/kg 及び 200 μg/kg 相当量を添加した試料を用いて, 10 試験室で本法による共同試験を実施した。その結果, とうもろこしの平均回収率は 92.7%, その繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD<sub>f</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) として 4.3%及び 12%であり, HorRat は 0.54 であった。また, アルファルファヘイの平均回収率は 83.1%, その繰返し精度及び室間再現精度は RSD<sub>f</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 4.1%及び 12%であり, HorRat は 0.96 であった。

## 謝 辞

共同試験にご協力をいただいた財団法人日本食品分析センター，財団法人マイコトキシン検査協会，社団法人日本科学飼料協会，全国酪農業協同組合連合会及びアジレント・テクノロジー株式会社の試験室の各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 財団法人日本食品分析センター：平成 17 年度の飼料の有害物質等残留基準設定等委託事業（分析法の開発）飼料中の有害物質等の分析法の開発（2006）.
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成20年4月1日，19消安第14729号（2008）.
- 3) 上路雅子，小林裕子，中村幸二編著：残留農薬分析法 2002 年度版（ソフトサイエンス社）.

## 5 乾牧草中のテブコナゾールのガスクロマトグラフ質量分析計による簡易定量法

野村 昌代\*

### Simplified Method for Determination of Tebuconazole in Grass Hay by GC-MS

Masayo NOMURA\*

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

A simplified analytical method for determination of tebuconazole in grass hay using gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) was developed. After addition of acetonitrile-water (3:1) to samples, tebuconazole was extracted with acetonitrile. The extract was filtered and filled up to 200 mL with acetonitrile. After the sample solution was evaporated to dryness and dissolved in water, it was purified by Chem Elut cartridge with hexane. The eluate was evaporated to dryness and dissolved in hexane. It was purified by Sep-Pak Plus Florisil cartridge with hexane-acetone (7:3). The eluate was evaporated to dryness and dissolved in dilute solution, and subjected to GC-MS on fused silica capillary column (HP-5MS; 0.25 mm i.d.×30 m, film thickness: 0.25 μm) for determination of tebuconazole. A recovery test was conducted with four kinds of grass hay spiked with tebuconazole at 0.5 and 30 mg/kg. The mean recoveries of tebuconazole were 87.7~99.4% and the relative standard deviations (RSD) were within 8.2%. A collaborative study was conducted in ten laboratories using two kinds of grass hay spiked with tebuconazole at 20 mg/kg. The mean recovery of tebuconazole in oats hay was 91.5%, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>F</sub> and RSD<sub>R</sub>) were 5.8% and 9.7% respectively. For timothy hay, these values were 93.5%, 3.1% and 9.0%, respectively.

**Key words:** 残留農薬 pesticide residue ; トリアゾール系殺菌剤 triazole fungicide ; テブコナゾール tebuconazole ; ガスクロマトグラフ質量分析計 gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) ; 多孔性ケイソウ土カートリッジ porous-diatomite cartridge ; フロリジルカートリッジ Florisil cartridge ; 共同試験 collaborative study ; 乾牧草 grass hay

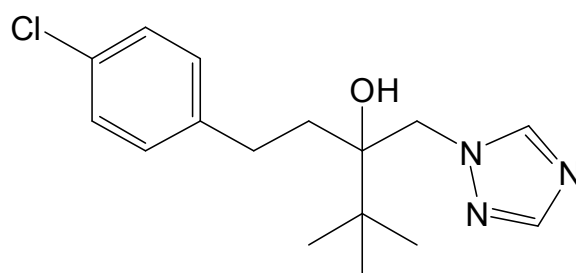
### 1 緒 言

テブコナゾール [C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>3</sub>O] (Fig. 1)<sup>1),2)</sup>は Bayer 社が開発したトリアゾール系殺菌剤であり、菌糸の正常な生育を抑制し、異常分枝を起こしたり、吸器の形成を阻止したりする。殺菌作用は脂質(ステロール)生合成阻害であることが解明されている。日本では1996年に登録され、適用作物も多い。

\* 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

国内の食品，添加物等の規格基準値における残留農薬基準値は，麦・穀類で 0.05~0.5 ppm，豆類で 0.1~0.5 ppm，果実で 0.2~4 ppm，野菜で 0.02~1 ppm，綿実で 1 ppm となっている<sup>3)</sup>。

飼料中のテブコナゾールの定量法は，青山ら<sup>4)</sup>が検討した個別分析法が平成 18 年 3 月 24 日付けで飼料分析基準<sup>5)</sup>（以下「現行法」という．）に記載されているが，諸外国の牧草類の基準値は 2~30 ppm に設定されており，乾牧草における高濃度の添加回収試験が未実施であったため，今回，高濃度にも対応した分析法を検討した．現行法では，乾牧草中の高濃度の添加回収試験において回収率が低くなる傾向が認められたため，現行法の操作の一部を省略した，財団法人日本食品分析センターが開発した分析法（以下「分析センター法」という．）<sup>6)</sup>を基に，飼料検査分析法（飼料分析基準）への可否についての検討を行ったのでその概要を報告する．



Tebuconazole

(*RS*)-1-*p*-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol

C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>3</sub>O MW: 307.8

CAS No.: 107534-96-3

Fig. 1 Structure of tebuconazole

## 2 実験方法

### 2.1 試料

市販の乾牧草（オーツヘイ，アルファルファヘイ，チモシーヘイ及びバミューダグラスストロー）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎して用いた．

### 2.2 試薬

#### 1) テブコナゾール標準液

テブコナゾール標準品（和光純薬工業製，純度 98%）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，テブコナゾール標準原液を調製した（この液 1 mL はテブコナゾール 0.5 mg を含有する．）．使用に際して，標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し，1 mL 中にテブコナゾールとして 0.001，0.005，0.01，0.05，0.1，0.5 及び 1.5 µg を含有する各テブコナゾール標準液を調製した．

#### 2) 希釈溶媒

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）100 mL にポリエチレングリコール 50 µL を加えて希釈溶媒を調製した．

#### 3) 試薬等

アセトニトリル，アセトン及びヘキサンは残留農薬試験用試薬を，ポリエチレングリコールは平均分子量 400（残留農薬試験用）の試薬を，2,2,4-トリメチルペンタンは高速液体クロマトグラフ用試薬を用いた．その他，特記している以外の試薬については特級を用いた．

### 2.3 装置及び器具

- 1) ガスクロマトグラフ質量分析計：島津製作所製 GCMS-QP2010
- 2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカーSR-2W
- 3) エバポレーター：柴田科学機械工業製 R-114
- 4) 多孔性ケイソウ土カートリッジ：Varian 製 EXTUBE Extraction Columns Chem Elut 1020 (20 mL 容)
- 5) フロリジルカートリッジ：Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil (充てん剤量 910 mg)

### 2.4 定量方法

#### 1) 含水アセトニトリル抽出

分析試料 10.0 g を 200 mL の共栓三角フラスコにとり、アセトニトリル-水 (3+1) 20 mL を加えた後 10 分間静置し、更にアセトニトリル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、容器及び残さをアセトニトリル 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過し、更に全量フラスコの標線までアセトニトリルを加えた。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、水 20 mL を加えて残留物を溶かし、多孔性ケイソウ土カートリッジ処理に供する試料溶液とした。

#### 2) 多孔性ケイソウ土カートリッジ処理

試料溶液を多孔性ケイソウ土カートリッジに入れ、5 分間静置した。200 mL のなす形フラスコを多孔性ケイソウ土カートリッジの下に置き、容器をヘキサン 20 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次多孔性ケイソウ土カートリッジに加え、更に、ヘキサン 60 mL を多孔性ケイソウ土カートリッジに加えて、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、テブコナゾールを溶出させた。溶出液を 40°C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。ヘキサン 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、フロリジルカートリッジ処理に供する試料溶液とした。

#### 3) フロリジルカートリッジ処理

フロリジルカートリッジを注射筒に連結し、あらかじめヘキサン 5 mL で洗浄した。試料溶液 2 mL を正確に注射筒に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。注射筒にヘキサン 4 mL を加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させ、更にヘキサン-アセトン (19+1) 10 mL をフロリジルカートリッジに加えて液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。50 mL のなす形フラスコをフロリジルカートリッジの下に置き、ヘキサン-アセトン (7+3) 15 mL をフロリジルカートリッジに加えてテブコナゾールを溶出させた。溶出液を 40°C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。希釈溶媒 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

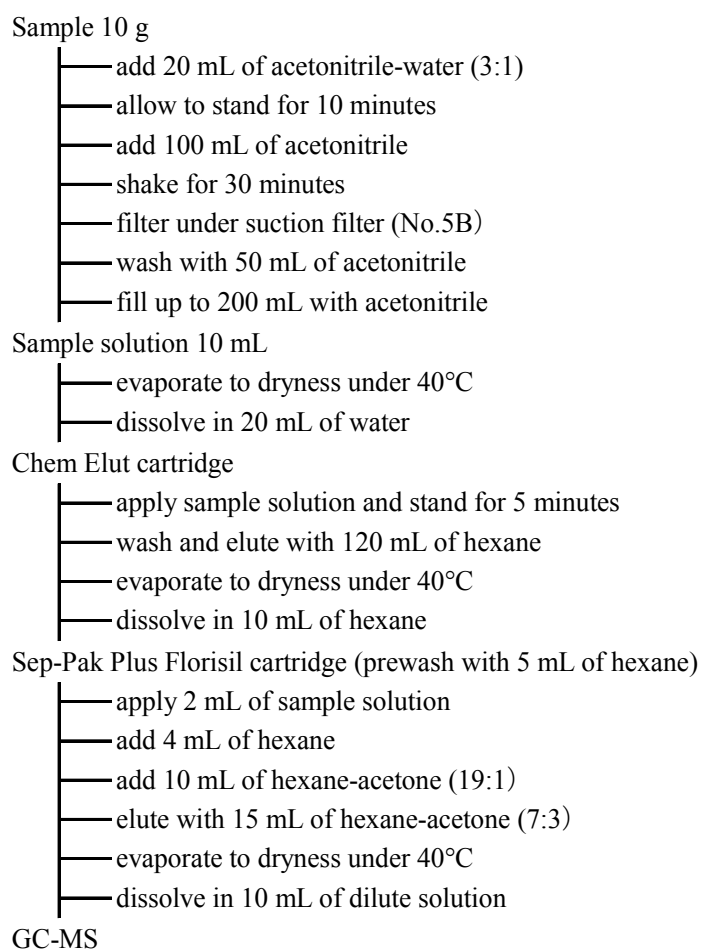
#### 4) ガスクロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各テブコナゾール標準液各 2  $\mu$ L をガスクロマトグラフ質量分析計 (以下「GC-MS」という。) 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。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、試料中のテブコナゾールの量を算出した。

なお、GC-MS の測定条件を Table 1 に、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

**Table 1 Operating conditions for GC-MS**

Column	HP-5MS (0.25 mm i.d×30 m, film thickness; 0.25 μm)
Column temp.	70°C (2 min)→20°C/min→280°C (10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection temp.	250°C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temp.	280°C
Ion source temp.	200°C
Ionization	Electron impact
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	<i>m/z</i> 250 (quantitation), 125 (confirmation)

**Scheme 1 Analytical procedure for tebuconazole**

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

調製した 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 及び 1.5 μg/mL の各テブコナゾール標準液各 2 μL を GC-MS に注入し, 得られた SIM クロマトグラムでのピーク高さ又は面積から検量線を作成した. その結果, 検量線は 0.002~3.0 ng の範囲で原点を通る直線性を示した.

### 3.2 多孔性ケイソウ土カートリッジ処理の検討

多孔性ケイソウ土カートリッジ処理によるテブコナゾールの溶出画分の確認を行った。

乾牧草（チモシーヘイ）にテブコナゾール標準液を 1 mg/kg 相当量を添加し，本法により操作した後，多孔性ケイソウ土カートリッジに供しヘキサンにより溶出した．各溶出液について，本法によりフロリジルカートリッジ処理を行い，溶出画分の回収率を確認した。

その結果，Table 2 のとおりテブコナゾールは 0~120 mL に溶出し，120 mL 以後の画分には溶出されなかった．以上の結果から本法では現行法及び分析センター法と同様に，ヘキサン 120 mL で溶出することとした。

**Table 2 Elution pattern of tebuconazole from Chem Elut cartridge**

Fraction volume (mL)	0~40	40~80	80~100	100~120	120~140	140~160	Total
Tebuconazole	87	20	2	1	0	0	110

(%)

### 3.3 フロリジルカートリッジ処理の検討

フロリジルカートリッジ処理によるテブコナゾールの溶出画分の確認を行った。

乾牧草（チモシーヘイ）にテブコナゾール標準液を 1 mg/kg 相当量を添加し，本法により操作した後，フロリジルカートリッジ処理を行い，溶出画分の回収率を確認した。

その結果，Table 3 のとおりテブコナゾールはヘキサン-アセトン（7+3）0~15 mL の画分に溶出し，15 mL 以後の画分には溶出されなかった．以上の結果から現行法ではヘキサン-アセトン（7+3）の溶出溶媒は 20 mL としているが，本法では溶出に用いるヘキサン-アセトン（7+3）の量は分析センター法と同様に 15 mL で十分と考えられた。

**Table 3 Elution pattern of tebuconazole from Florisil cartridge**

Fraction volume (mL)	0~15	15~20	20~25	25~30	Total
Tebuconazole	107	0	0	0	107

(%)

### 3.4 添加回収試験

乾牧草（オーツヘイ，アルファルファヘイ，チモシーヘイ及びバミューダグラスストロー）にテブコナゾールとして 0.5 及び 30 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて，本法に従って回収率及び繰返し精度を検討した．その結果，Table 4 のとおり平均回収率は 87.7~99.4%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 8.2% 以下の結果が得られた。

なお，添加回収試験で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

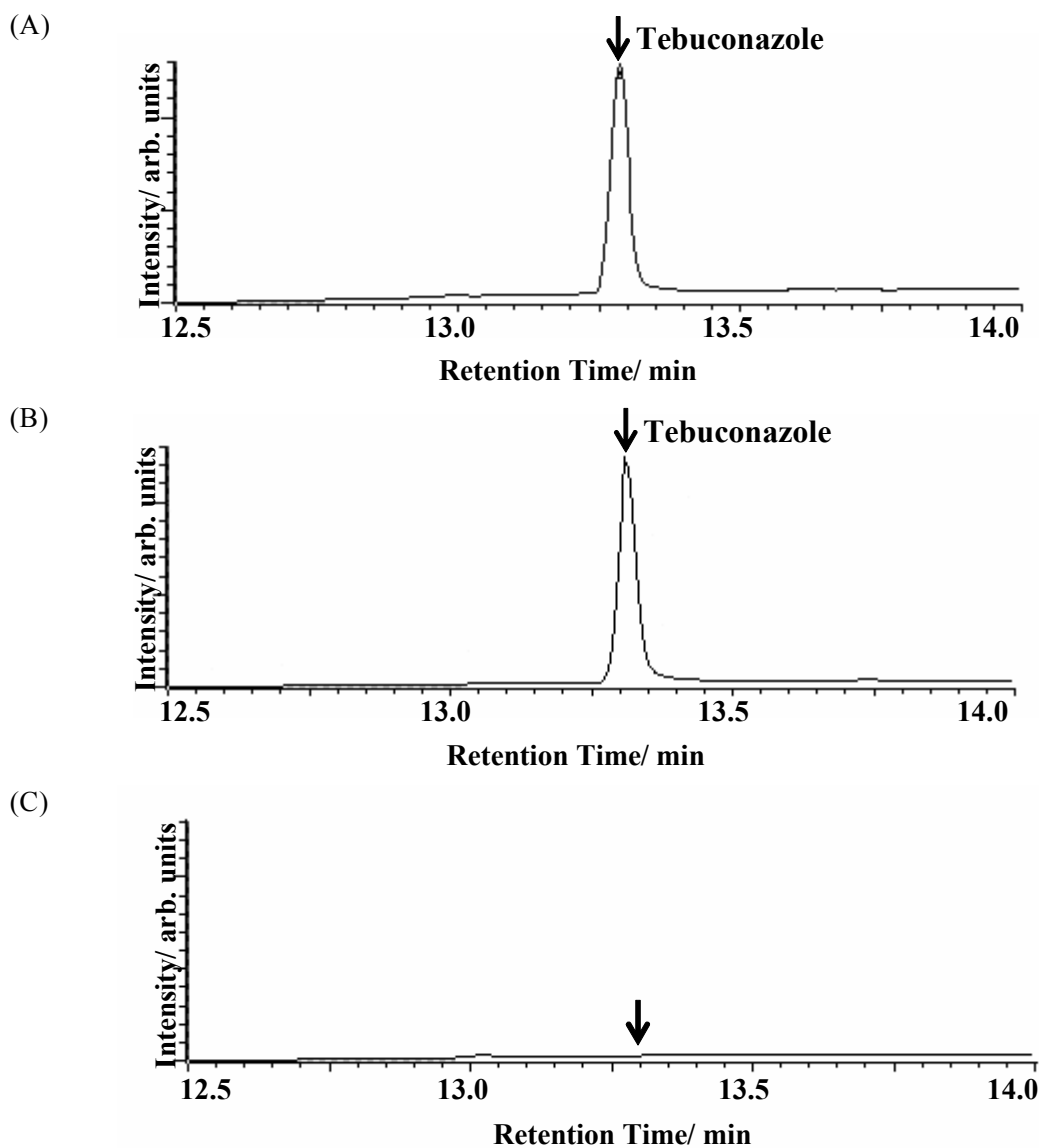


**Table 4 Recoveries of tebuconazole spiked at 0.5 and 30 mg/kg in four kinds of grass hay (%)**

Spiked level (mg/kg)	Oats hay		Alfalfa hay		Timothy hay		Bermudagrass straw	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
0.5	98.8	(1.5)	93.5	(5.2)	93.5	(1.7)	99.4	(2.8)
30	93.3	(2.3)	88.8	(2.6)	94.3	(8.2)	87.7	(5.4)

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviations of repeatability



**Fig. 2 GC-MS chromatograms of the standard solution and sample solution**

GC-MS conditions are shown in Table 1.

(A) Standard solution (The amount of tebuconazole is 0.3 ng.)

(B) Sample solution of timothy spiked at 30 mg/kg

(C) Sample solution of timothy (not spiked)

### 3.5 定量下限及び検出下限

乾牧草の試料溶液 2  $\mu\text{L}$  を GC-MS に注入し、得られたピークの SN 比が 10 となる濃度を定量下限とした。得られたピークの SN 比が 10 となるテブコナゾールの試料中の濃度は 0.5 mg/kg 相当量となったため、本法の定量下限は 0.5 mg/kg であると考えられた。また、同様にピークの SN 比が 3 となる濃度から、本法の検出下限は 0.2 mg/kg であると考えられた。

### 3.6 現行法の定量の上限

現行法の定量の上限を求めるため、添加回収試験を実施した。乾牧草（チモシーヘイ）にテブコナゾールとしてそれぞれ 0.5, 1.0, 5.0, 10, 15 及び 30 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、現行法に従って操作を行った後、試料溶液を適宜希釈し、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて定量した。

得られた添加回収試験の結果は Table 5 のとおりであり、10 mg/kg 以上の高濃度の添加回収試験では回収率が低くなる傾向がみられ、高濃度では、ゲル浸透クロマトグラフィー操作において回収率が低下すると考えられた。これらのことから、現行法による定量は、5 mg/kg 相当量まで可能と考えられた。

**Table 5 Recoveries of tebuconazole by the existing method (%)**

Spiked level (mg/kg)	Timothy hay	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
0.5	82.0	( 8.2)
1.0	81.5	(10 )
5.0	78.1	(11 )
10	69.5	( 7.4)
15	69.6	( 6.0)
30	69.3	( 2.5)

a) Mean recoveries ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.7 適用範囲

現行法は 10 mg/kg 以上の添加回収試験において回収率が低くなる傾向が認められたが、本法は 0.5~30 mg/kg での添加回収率に問題が認められなかったため、現行法で 5 mg/kg を超えた試料については、本法で確認のための試験をするべきと考えられた。

### 3.8 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

乾牧草（オーツヘイ及びチモシーヘイ）にテブコナゾールとして 20 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、アジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンター、株式会社島津総合分析試験センター、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、全国酪農業協同組合連合会分析センター、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同名古屋センター、同福岡センター及び同神戸

センター大阪事務所（10 試験室）において本法に従って共同試験を実施した。

その結果は Table 6 のとおりであり、オーツヘイの平均回収率は 91.5%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（ $RSD_r$  及び  $RSD_R$ ）として 5.8% 及び 9.7% であり，HorRat は 0.94 であった。

また，チモシーヘイの平均回収率は 93.5%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 3.1% 及び 9.0% であり，HorRat は 0.87 であった。

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

**Table 6 Collaborative study results of tebuconazole**

Lab. No.	(mg/kg)			
	Oats hay		Timothy hay	
1	16.6	16.3	16.0	16.0
2	18.7	18.0	18.2	18.0
3	20.3	20.8	20.5	21.4
4	18.8	19.5	19.1	20.0
5	19.8	20.4	20.6	19.3
6	18.0	16.8	14.4 <sup>d)</sup>	20.9 <sup>d)</sup>
7	19.8	16.1	20.5	19.0
8	17.8	20.0	18.6	18.7
9	15.0	15.6	16.3	16.5
10	18.7	19.2	18.9	18.3
Spiked level (mg/kg)	20.0		20.0	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	18.3		18.7	
Recovery (%)	91.5		93.5	
$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	5.8		3.1	
$RSD_R$ <sup>c)</sup> (%)	9.7		9.0	
HorRat	0.94		0.87	

a) Oats hay:  $n=20$ , Timothy hay:  $n=18$  (without Lab. No. 6)

b) Relative standard deviations of repeatability within same laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Excluded by the Cochran test

Table 7 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	Column (i.d.×length, film thickness)
1	Shimadzu GCMS-Q2010 Plus	Restek Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
2	Shimadzu GCMS-Q2010 Plus	Restek Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
3	Thermo Electron FOCUS-Polaris Q GC/MS Benchtop Ion Trap Mass Spectrometer	Thermo Electron TR-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
4	Shimadzu GCMS-Q2010	Restek Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
5	Shimadzu GCMS-Q2010	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
6	GC: Agilent Technologies 7890 GC MS: Agilent Technologies 5975C MSD	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
7	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5973	Agilent Technologies HP-5MSI (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
8	GC: Agilent Technologies 6890 MS: Agilent Technologies 5973N	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
9	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5975B	Agilent Technologies DB-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
10	Shimadzu GCMS-Q2010	Phenomenex ZB-1 (0.32 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)

#### 4 まとめ

乾牧草中のテブコナゾールについて、ガスクロマトグラフ質量分析計による簡易定量法を検討したところ、次の結果が得られた。

- 1) テブコナゾールの検量線は 0.002~3.0 ng の範囲で原点を通る直線性を示した。
- 2) 多孔性ケイソウ土カートリッジ処理の溶出画分の確認を行ったところ、溶出溶媒の必要量は 120 mL であった。
- 3) フロリジルカートリッジ処理の溶出画分の確認を行ったところ、溶出溶媒の必要量は 15 mL であった。
- 4) 4 種類の乾牧草（オーツヘイ，アルファルファヘイ，チモシーヘイ及びバミューダグラスストロー）を用いて、テブコナゾールとして 0.5 mg/kg 及び 30 mg/kg 相当量添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 87.7~99.4 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 8.2%以下の結果が得られた。
- 5) 本法によるテブコナゾールの定量下限は 0.5 mg/kg，検出下限は 0.2 mg/kg と考えられた。
- 6) 現行法により添加回収試験を実施した結果、現行法による定量の上限は、5 mg/kg と考えられた。
- 7) 乾牧草（オーツヘイ及びチモシーヘイ）にテブコナゾールとして 20 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よる共同試験を実施した。その結果、オーツヘイの平均回収率は 91.5%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub>）として 5.8%及び 9.7%であり、HorRat は 0.94 であった。また、チモシーヘイの平均回収率は 93.5%，

その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 3.1%及び 9.0%であり、HorRat は 0.87 であった。

以上の結果から、現行法で 5 mg/kg を超えた試料については、本法を適用するべきと考えられた。

### 謝 辞

共同試験に参加していただいたアジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンター、株式会社島津総合分析試験センター、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び全国酪農業協同組合連合会分析センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) 社団法人日本植物防疫協会編集：農薬ハンドブック 2005 年版（改訂新版），社団法人 日本植物防疫協会（2005）.
- 2) C.D.S. Tomlin. ed. : “The e-Pesticide Manual: A world compendium Version 4.0 2006-07”, 14th Ed., British Crop Production Council (2006).
- 3) 厚生省告示：“食品，添加物等の規格基準”，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959).  
改正：“食品，添加物等の規格基準の一部を改正する件”，平成 17 年 11 月 29 日，厚生労働省告示第 499 号 (2005).
- 4) 青山恵介，井上智江：飼料研究報告，30，7 (2005).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 6) 財団法人日本食品分析センター：平成 18 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業飼料中の有害物質等の分析法の開発，X (2007).

## 6 配合飼料中のサリノマイシンナトリウム, センデュラマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムの液体クロマトグラフ質量分析計による一斉微量定量法

牧野 大作\*, 山田 美帆\*

### **Simultaneous Microdetermination of Salinomycin Sodium, Semduramicin Sodium, Narasin, Monensin Sodium and Lasalocid Sodium in Formula Feeds by LC-MS**

Daisaku MAKINO\* and Miho YAMADA\*

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

A simultaneous analytical method for microdetermination of five polyether antibiotics (salinomycin sodium (SL), semduramicin sodium (SD), narasin (NR), monensin sodium (MN) and lasalocid sodium (LS)) in formula feeds using liquid chromatograph-electrospray ionization-mass spectrometer (LC-ESI-MS) was developed. These antibiotics in formula feeds were extracted with acetonitrile. The extract was filtrated with a filter paper. After the filtrates of 25 mL were evaporated to dryness, they were dissolved in hexane-ethyl acetate (9:1). The whole solutions were applied to silica-gel mini column. The solutions were washed with hexane-ethyl acetate (9:1), and then eluted with hexane-ethanol (4:1) and subjected to LC-ESI-MS for determination of antibiotics. The LC separation was carried out on an ODS column (Phenomenex Gemini 5  $\mu$  C18 110 Å, 2 mm i.d.×150 mm, 5  $\mu$ m) using acetonitrile-5 mmol/L ammonium acetate (4:1) as a mobile phase. The determination was performed in a selected ion monitoring (SIM) mode. A recovery test was conducted using three kinds of formula feed added with each polyether antibiotic at levels of 0.5 and 5 g(potency)/tons. These resulted in the mean recovery of SL of 89.7~98.8%, and the relative standard deviations (RSD) of within 2.9%. These values were 80.0~90.0% and 10% for SD; 83.0~89.7% and 13% for NR; 104~109% and 1.5% for MN; and 85.2~94.5% and 4.5% for LS respectively. A collaborative study was conducted in eight laboratories using formula feed for layers added with each polyether antibiotic at 0.5 g(potency)/tons. The mean recovery of SL was 95.0%, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation ( $RSD_r$  and  $RSD_R$ ) and HorRat were 2.7%, 6.4% and 0.36 respectively. These values were 98.6%, 2.6%, 8.0% and 0.45 for SD; 88.5%, 3.5%, 5.7% and 0.31 for NR; 101%, 3.6%, 5.0% and 0.28 for MN; and 93.3%, 3.8%, 8.2% and 0.46 for LS respectively.

**Key words:** 抗生物質 antibiotics ; ポリエーテル系抗生物質 polyether antibiotics ; サリノマイシンナトリウム salinomycin sodium ; センデュラマイシンナトリウム semduramicin sodium ; ナラシン narasin ; モネンシンナトリウム monensin sodium ; ラサロシドナトリウム lasalocid sodium ; 配合飼料 formula feed ; 液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) ; エレクトロスプレーイオン化法 electrospray ionization (ESI) ; 共同試験 collaborative study

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

## 1 緒 言

サリノマイシンナトリウム (SL) , センデュラマイシンナトリウム (SD) , ナラシン (NR) , モネンシンナトリウム (MN) 及びラサロシドナトリウム (LS) は, ポリエーテル系の抗生物質であり, 抗コクシジウム作用及びグラム陽性菌の一部に対する抗菌活性を示すことから, 飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進を用途として飼料添加物に指定<sup>1)</sup>されている。

これらを含むことができる飼料の種類及び添加量は, 飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令<sup>2)</sup>に規定されており, 対象とする飼料以外の飼料には含んではならない。

現在, サリノマイシンナトリウム, センデュラマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムの配合飼料中の定量法としては, 微生物学的定量法<sup>3)-10)</sup>及び液体クロマトグラフ法<sup>11)-15)</sup>が報告されており, これらを基とした定量法が飼料分析基準<sup>16)</sup>に収載されている。

微量定量法としては, 配合飼料中に残留した微量のサリノマイシンナトリウム, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムをバイオオートグラフにより定量する方法<sup>17)</sup>が飼料分析基準に収載されているが, 16~24 時間の培養を伴うため, 迅速性に欠点がある。また, センデュラマイシンナトリウム及びナラシンについては, 微量定量法は収載されていない。

近年, 食品中及び飼料中に残留したポリエーテル系抗生物質の定量法としては, 迅速性及び簡便性の観点から, 液体クロマトグラフ質量分析計を用いた方法<sup>18), 19)</sup>が報告されている。

そこで筆者らは, 前述の飼料分析基準に収載されているバイオオートグラフ法<sup>17)</sup>の試料溶液の調製方法を参考として, 液体クロマトグラフ質量分析計を用いたサリノマイシンナトリウム, センデュラマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムの一斉微量定量法を検討したので, その概要を報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試料の調製

抗菌性物質を含まない市販の配合飼料をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し, それぞれにサリノマイシンナトリウム製剤 (100 mg(力価)/g, 科学飼料研究所製), センデュラマイシンナトリウム製剤 (50 mg(力価)/g, コーキン化学製), ナラシン製剤 (100 mg(力価)/g, 日本イーライリリー販売), モネンシンナトリウム製剤 (200 mg(力価)/g, 科学飼料研究所製) 及びラサロシドナトリウム製剤 (150 mg(力価)/g, 科学飼料研究所製) を添加し, サリノマイシンナトリウム, センデュラマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムとしてそれぞれ 0.5 及び 5 g(力価)/t 相当量を含む試料を調製した。

添加回収試験に用いた配合飼料 (成鶏飼育用, 肉豚肥育用及び肉用牛肥育用) の配合割合は, Table 1 のとおりである。

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

Kind of formula feed	Group of ingredients	Ratio (%)	Ingredients
For layer	Grains	59	Corn
	Oil meals	25	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn gluten meal
	Animal by-products	1	Fish meal
	Brans	1	Rice bran
	Others	14	Calcium carbonate, Calcium phosphate, Paprika extract, Feed additives
For finishing pig	Grains	78	Corn
	Brans	9	Wheat bran
	Oil meals	8	Soybean meal
	Animal by-products	3	Fish meal
	Others	2	Calcium phosphate, Calcium carbonate, Salt, Feed additives
For beef cattle	Grains	63	Corn, Milo, Barley
	Brans	18	Wheat bran, Rice bran, Corn gluten feed
	Oil meals	10	Soybean meal
	Others	9	Alfalfa, Molasses, Calcium carbonate, Salt, Feed additives

## 2.2 試薬等

### 1) サリノマイシンナトリウム標準原液

常用標準サリノマイシン（飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）別表第 2 の 6 の(13)に規定する常用標準品をいう。以下同じ。）適量を減圧下（0.67 kPa 以下），60°C で 3 時間乾燥した後，20 mg(力価)相当量を正確に量り 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に同溶媒を標線まで加えて標準原液を調製した（この液 1 mL は，サリノマイシンナトリウムとして 0.2 mg(力価)を含有する。）。

### 2) センデュラマイシンナトリウム標準原液

常用標準センデュラマイシン 20 mg(力価)相当量を正確に量り 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に同溶媒を標線まで加えて標準原液を調製した（この液 1 mL は，センデュラマイシンナトリウムとして 0.2 mg(力価)を含有する。）。

### 3) ナラシン標準原液

常用標準ナラシン 20 mg(力価)相当量を正確に量り 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に同溶媒を標線まで加えて標準原液を調製した（この液 1 mL は，ナラシンとして 0.2 mg(力価)を含有する。）。

### 4) モネンシンナトリウム標準原液

常用標準モネンシン 20 mg(力価)相当量を正確に量り 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に同溶媒を標線まで加えて標準原液を調製した（この液 1 mL は，モネンシンナトリウムとして 0.2 mg(力価)を含有する。）。

### 5) ラサロシドナトリウム標準原液

常用標準ラサロシド 20 mg(力価)相当量を正確に量り 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に同溶媒を標線まで加えて標準原液を調製した（この液 1 mL は，ラサロシドナトリウムとして 0.2 mg(力価)を含有する。）。



## 6) 混合標準液

使用に際して、サリノマイシンナトリウム標準原液、センデュラマイシンナトリウム標準原液、ナラシン標準原液、モネンシンナトリウム標準原液及びピラサロシドナトリウム標準原液の一定量を混合してメタノールで正確に希釈し、1 mL 中に各抗生物質としてそれぞれ 0.1, 0.125, 0.25, 0.5, 1 及び 2 µg(力価)を含有する各混合標準液を調製した。

7) アセトニトリル、メタノール及び蒸留水は、液体クロマトグラフ用を用いた。ヘキサン及び酢酸エチルは、残留農薬試験用を用いた。エタノールは、特級 99.5%を用いた。その他、特記している以外の試薬は、特級を用いた。

## 2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ：島津製作所製 Prominence
- 2) 質量分析計：島津製作所製 LCMS-2010EV
- 3) マグネチックスターラー：柴田科学製 MU-4
- 4) ロータリーエバポレーター：東京理化学器械製 N-1N 型
- 5) 高速遠心分離器：日立製作所製 SCT15B
- 6) シリカゲルミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Silica (充てん剤量 690 mg) に 10 mL のリザーバーを連結したもの

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過した。ろ液 25 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40°C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

ヘキサン-酢酸エチル (9+1) 10 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とした。

### 2) カラム処理

シリカゲルミニカラムをヘキサン 10 mL で洗浄し、あらかじめ硫酸ナトリウム (無水) 約 20 g を入れた漏斗をミニカラムのリザーバー部分の上に置いた。

試料溶液を漏斗に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下させた。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 (9+1) 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次漏斗に加え、同様に流下させた。更に漏斗中の硫酸ナトリウムをヘキサン-酢酸エチル (9+1) 5 mL で洗浄し、同様に流下させた後、漏斗をとりはずし、ヘキサン-酢酸エチル (9+1) 10 mL をミニカラムに加え、洗浄した。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-エタノール (4+1) 15 mL をミニカラムに加えて各抗生物質を溶出させた。溶出液を 40°C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

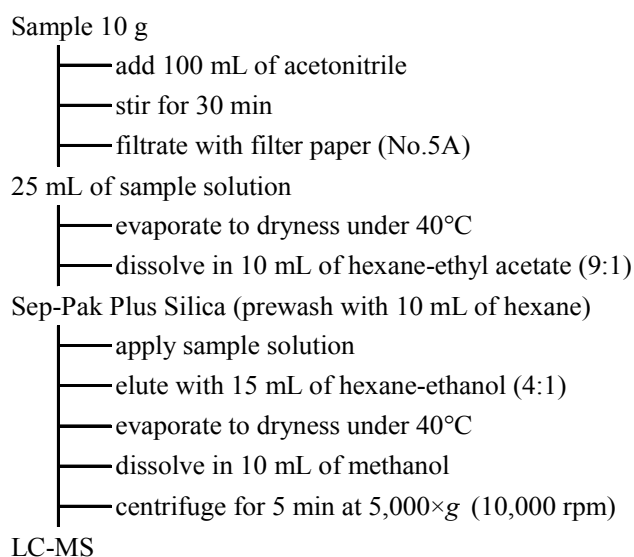
メタノール 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10,000 rpm (5,000×g) で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

### 3) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出 (SIM) クロマトグラムを作成し、ピーク面積又は高さより、試料中の各抗生物質量を算出

した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に、液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件を Table 2 に示した。



**Scheme 1 Analytical procedure for polyether antibiotics in formula feed**

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

Column	Phenomenex Gemini 5 $\mu$ C18 110 Å (2 mm i.d.×150 mm, 5 $\mu$ m)
Mobile phase	Acetonitrile-5 mmol/L ammonium acetate solution (4:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temp.	40°C
Injection volume	5 $\mu$ L
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N <sub>2</sub> (1.5 L/min)
Heat block temp.	200°C
CDL temp.	250°C
Monitor ion	<i>m/z</i> 769 (salinomycin), 891 (semduramicin), 783 (narasin A), 688 (monensin A), 608 (lasalocid)

### 3 結果及び考察

#### 3.1 質量分析計条件の検討

ポリエーテル系の抗生物質のイオン化法としてエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法の正イオンモードによるものが知られており<sup>18), 19)</sup>, 本法もこのイオン化法を用いて検討した。

サリノマイシンナトリウム, センデュラマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウム各標準液について, 本法の測定条件によりスキャンモードで測定したところ, Fig. 1 に示す各マススペクトルが得られた。

各標準液のマススペクトルにおいて, 最も強度の大きいピークはそれぞれ, サリノマイシン, センデュラマイシン, ナラシン, モネンシン及びラサロシドで *m/z* 769, 891, 783, 688 及び 608 (すべてアンモニウム付加イオン [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>) であった。

よって、これらをモニターイオンとして採用することにした。

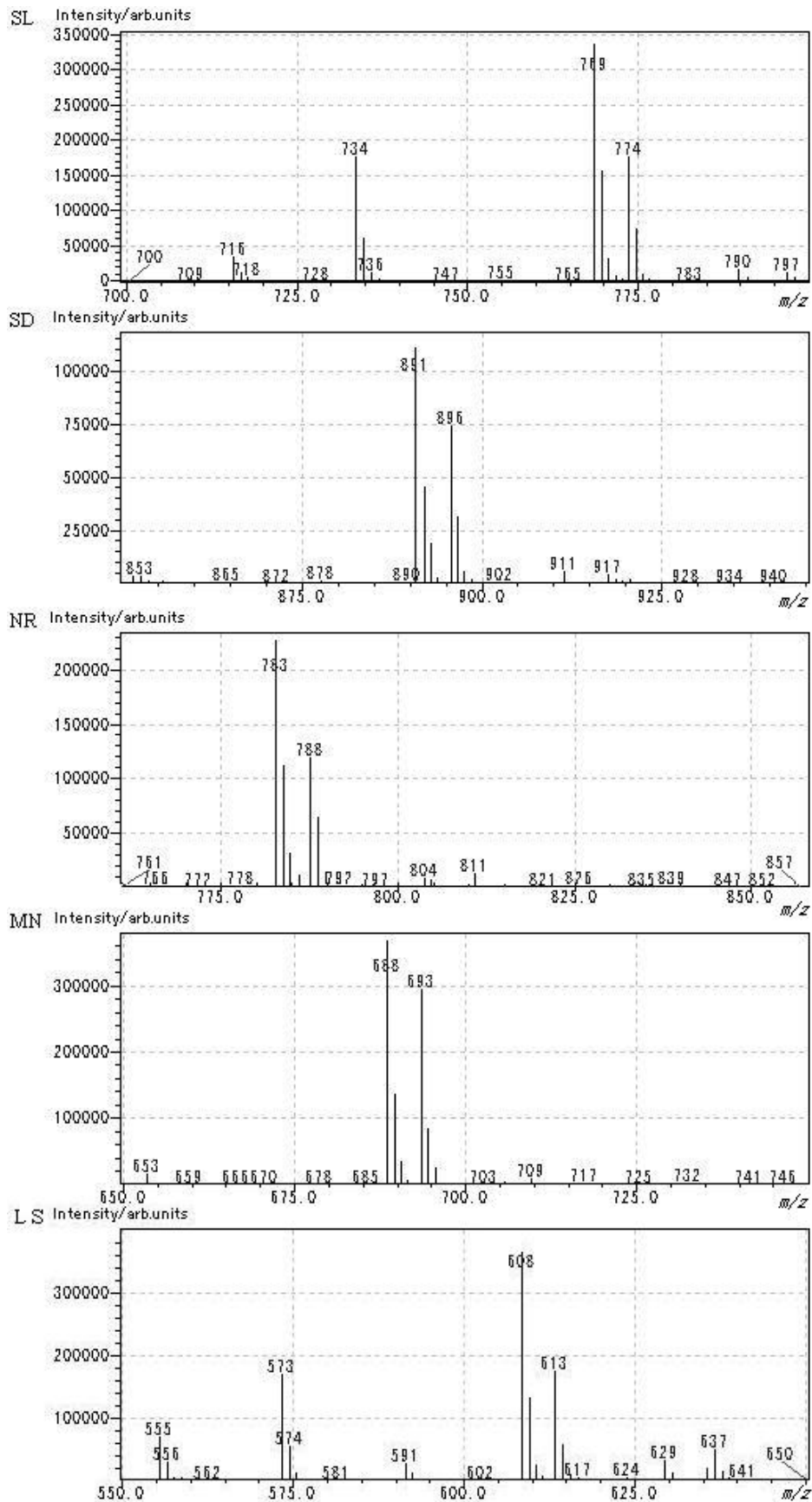


Fig. 1 Mass spectra of each standard solution

### 3.2 液体クロマトグラフィーの測定条件の検討

#### 1) 酢酸アンモニウム溶液の影響の検討

飼料分析基準に記載されている配合飼料中のサリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン及びモネンシンナトリウムの液体クロマトグラフによる定量法<sup>11)-14)</sup>では、溶離液にメタノール-水-酢酸(940+60+1)が使用されている。また、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた定量法では、酢酸アンモニウム溶液が多用されていることから、これらを考慮して、溶離液としてメタノール-水(9+1)とメタノール-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(9+1)を比較検討することにより、酢酸アンモニウム溶液の影響について検討した。

その結果、酢酸アンモニウム溶液を用いたものは用いなかった場合よりピーク形状は良好であったため、以後の検討では酢酸アンモニウム溶液を含む溶離液を使用することにした。

#### 2) 保持時間及び付加イオンの検討

一般的に使用される有機溶媒としてメタノール及びアセトニトリルを、また酢酸アンモニウム溶液の濃度については5及び10 mmol/Lを用いて検討を行った。

まず、メタノールを用いて、メタノール-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(9+1)及びメタノール-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(9+1)を検討したところ、いずれもモニターイオンは異なるものの、モネンシンとセンデュラマイシンの保持時間がきわめて近接していた。

そこで、保持時間を遅くするため、酢酸アンモニウム溶液の溶離液中の組成比率を増加させ、メタノール-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(4+1)及びメタノール-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(4+1)を検討したが、この傾向は変わらなかった。

次に、アセトニトリルを用いて、アセトニトリル-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(9+1)及びアセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(9+1)を検討したところ、各抗生物質とも、メタノールを用いた場合よりも保持時間が早くなった。

そこで、保持時間を遅くするため、先と同様にしてアセトニトリル-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(4+1)及びアセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(4+1)を検討したところ、いずれもピークの分離状況及び保持時間において良好な結果が得られた。ここで、アセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(4+1)を用いた場合において、サリノマイシン、センデュラマイシン、ナラシン、モネンシン及びラサロシドのマススペクトルにおける最も強度の大きいピークの付加イオンが全てアンモニウムイオンであったことから、酢酸アンモニウム溶液の濃度は5 mmol/Lで十分と考えられ、本法では溶離液をアセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(4+1)とすることにした。

### 3.3 検量線の作成

2.2の6)に従って調製した混合標準液各5 µLを液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、得られたSIMクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成した。その結果、検量線はいずれも0.5~10 ng(力価)の範囲で直線性を示した。

### 3.4 ミニカラムの検討

2.2の6)に従って調製した混合標準液を、成鶏飼育用配合飼料に0.5 g(力価)/t相当量添加した試料(以下「予備検討用試料」という。)について、飼料分析基準に記載されているバイオオートグラフによる微量定量法<sup>17)</sup>に従って、試料液を調製し、これを適宜希釈した溶液を、3.1及び3.2で検討した条件にて、液体クロマトグラフ質量分析計に供試した。その結果、サリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナ

トリウムとしての回収率は、それぞれ 95.1, 121, 93.4, 102 及び 73.4%であり、比較的良好な結果が得られたため、この方法を基としてその後の検討を進めた。

しかし、バイオオートグラフによる微量定量法では、目的成分をクロロホルム-酢酸エチル (9+1) に転溶し、シリカゲルミニカラムに負荷後、同溶媒で洗浄、最後にクロロホルム-メタノール (4+1) で溶出させることにより精製を行っている。近年、環境への負荷軽減及び分析者の健康面への影響の観点より溶媒使用量の減少及び塩素系溶媒の使用を避けることが望まれていることから、基本的に溶媒使用量が半分になるように変更し、かつクロロホルムを使用しない方法を検討した。

### 1) 負荷・洗浄液の検討

試料として予備検討用試料を使用し、クロロホルム-酢酸エチル (9+1) に替わる溶媒として、ジエチルエーテル-酢酸エチル (9+1) とヘキサン-酢酸エチル (9+1) を検討した。

その結果、ジエチルエーテル-酢酸エチル (9+1) を用いた場合は、目的成分がシリカゲルミニカラムに吸着せず、負荷後すぐに流出したが、ヘキサン-酢酸エチル (9+1) を用いた場合には、洗浄液として 10 mL 加えた後、更に 15 mL 加えても、目的成分は流出せず、カラムに保持できた。このことから、クロロホルム-酢酸エチル (9+1) に替えて、ヘキサン-酢酸エチル (9+1) を採用することにした。

### 2) 溶出溶媒の検討

試料として予備検討用試料を使用し、クロロホルム-メタノール (4+1) に替わる溶出溶媒を検討したところ、Table 3 の結果が得られた。

この結果からヘキサン-エタノールを使用した場合、良好な結果が得られる傾向があった。

ここで極性溶媒であるエタノールの量が少ないと目的成分の溶出が不十分になり、多すぎると妨害成分も溶出してくる可能性が考えられたことから、ヘキサン-エタノール (4+1) を溶出溶媒として採用することにした。

**Table 3 Influence of eluent compositions on recoveries**

Eluent	Amount of eluent (mL)	Kind of polyether antibiotics				
		LS	SD	MN	SL	NR
Hexane-ethyl acetate (9:1)	15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hexane-ethyl acetate (4:1)	15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hexane-acetone (9:1)	15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hexane-acetone (4:1)	15	29.3	0.0	79.0	9.4	0.0
Hexane-acetone (1:1)	15	63.5	74.8	84.6	82.5	55.9
Hexane-ethanol (9:1)	15	106.8	73.1	89.2	91.8	93.9
Hexane-ethanol (4:1)	15	86.3	76.3	88.2	91.3	94.9
Hexane-ethanol (1:1)	15	74.3	76.7	86.0	89.9	93.0

### 3) 溶出液量の検討

シリカゲルミニカラムからの溶出溶媒としてヘキサン-エタノール (4+1) を採用することとし、次に溶出液量の検討を行うため、試料として予備検討用試料を使用し、シリカゲルミニカラムからの溶出液を 3 mL ごとに分画し、各溶出画分について本法に従って測定し回収率を

求めた。

その結果は Table 4 のとおりであり、サリノマイシン、センデュラマイシン、ナラシン及びモネンシンについては溶出液量が 0~6 mL で溶出しているが、ラサロシドについては 0~12 mL で溶出していたことから、余裕をみて溶出液量は 15 mL とすることにした。

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

Fraction volume (mL)	Kind of polyether antibiotics					(Recovery: %)
	LS	SD	MN	SL	NR	
0 ~ 3	81.1	55.7	91.0	87.1	82.8	
3 ~ 6	5.8	38.2	4.8	1.7	1.5	
6 ~ 9	1.0	0	0	0	0	
9 ~ 12	0.03 <sup>a)</sup>	0	0	0	0	
12 ~ 15	0	0	0	0	0	
15 ~ 18	0	0	0	0	0	
18 ~ 21	0	0	0	0	0	
21 ~ 24	0	0	0	0	0	
24 ~ 27	0	0	0	0	0	
27 ~ 30	0	0	0	0	0	

a) Trace

### 3.5 試料採取量の検討

2.1 で調製した試料のうち、肉用牛肥育用配合飼料にサリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムとして 0.5 g(力価)/t 相当量添加した試料について、それぞれ 5.0, 7.5, 10, 15 及び 20 g を採取し、以下本法に従って回収率を求め、試料採取量の検討を行った。

その結果は Table 5 のとおり 5~20 g の範囲で概ね良好な回収率を得ることができたため、本法ではその中央値である 10 g を採取量とすることにした。

**Table 5 Comparison of the effect of different sample weight**

	Sample weight					(Recovery: %)
	5.0 g	7.5 g	10 g	15 g	20 g	
LS	93.1	95.4	90.5	94.0	88.5	
SD	108.8	107.7	93.0	101.7	101.9	
MN	107.8	103.2	103.9	101.0	100.8	
SL	104.5	100.0	91.2	97.3	94.5	
NR	92.6	107.5	95.7	86.5	90.5	

### 3.6 妨害物質の検討

現在、サリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウム以外に飼料添加物に指定されている抗生物質は 14 種類 (亜

鉛バシトラシン、アビラマイシン、エフロトマイシン、エンラマイシン、アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、セデカマイシン、DESTOマイシン A、ノシヘプタイド、バージニアマイシン、ビコザマイシン、フラボフォスフォルポール、硫酸コリスチン及びリン酸タイロシン)、また合成抗菌剤は7種類(アンプロリウム、エトパベート、クエン酸モランテル、スルファキノキサリン、デコキネート、ナイカルバジン及びハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウム)ある<sup>2)</sup>。

これらの標準品を各々最適な溶媒に溶解した後、メタノールを用いて調製した標準液を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

また、市販の配合飼料(成鶏飼育用(3種類)、肉豚肥育用、ほ乳期子牛育成用、幼令肉用牛育成用、肉用牛肥育用(2種類)及び乳用牛飼育用)を用い、本法により調製した試料溶液を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

なお、妨害物質の検討で得られたSIMクロマトグラムの一例をFig. 2に示した。

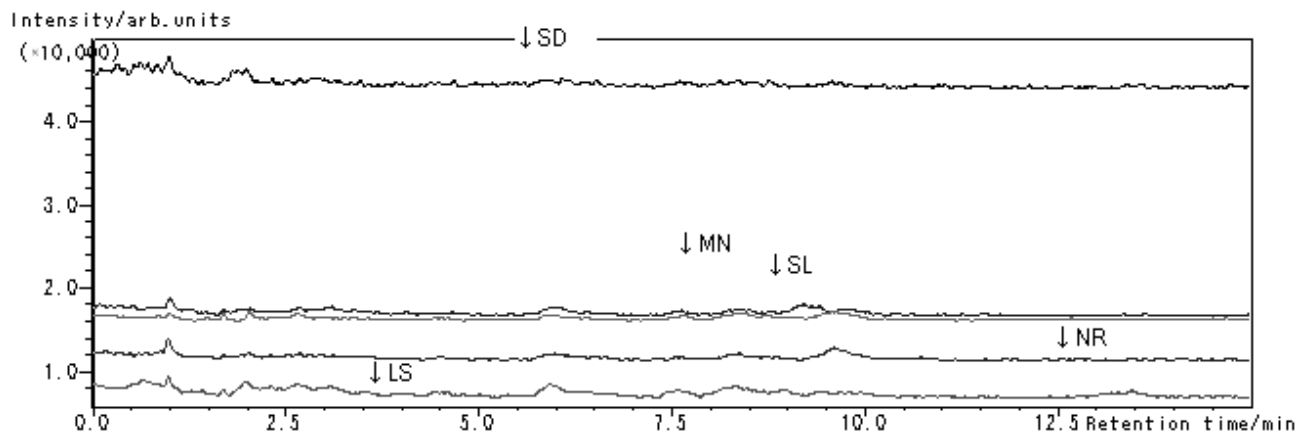


Fig. 2 SIM chromatograms of sample solution of typical formula feed for layer (not spiked)  
LC-MS conditions are shown in Table 2.

### 3.7 添加回収試験及び検出下限

2.1で調製した0.5及び5 g(力価)/tを添加した試料(配合飼料3種類)を用い、本法により3回繰り返し定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は、Table 6のとおり、サリノマイシンナトリウムについては、平均回収率89.7~98.8%、その繰返し精度は、相対標準偏差(RSD)として2.9%以下、センデュラマイシンナトリウムについては、平均回収率80.0~90.0%、その繰返し精度は、RSDとして10%以下、ナラシンについては、平均回収率83.0~89.7%、その繰返し精度は、RSDとして13%以下、モネンシンナトリウムについては、平均回収率104~109%、その繰返し精度は、RSDとして1.5%以下、ラサロシドナトリウムについては、平均回収率85.2~94.5%、その繰返し精度は、RSDとして4.5%以下の成績が得られた。なお、添加回収試験で得られたSIMクロマトグラムの一例をFig. 3に示した。

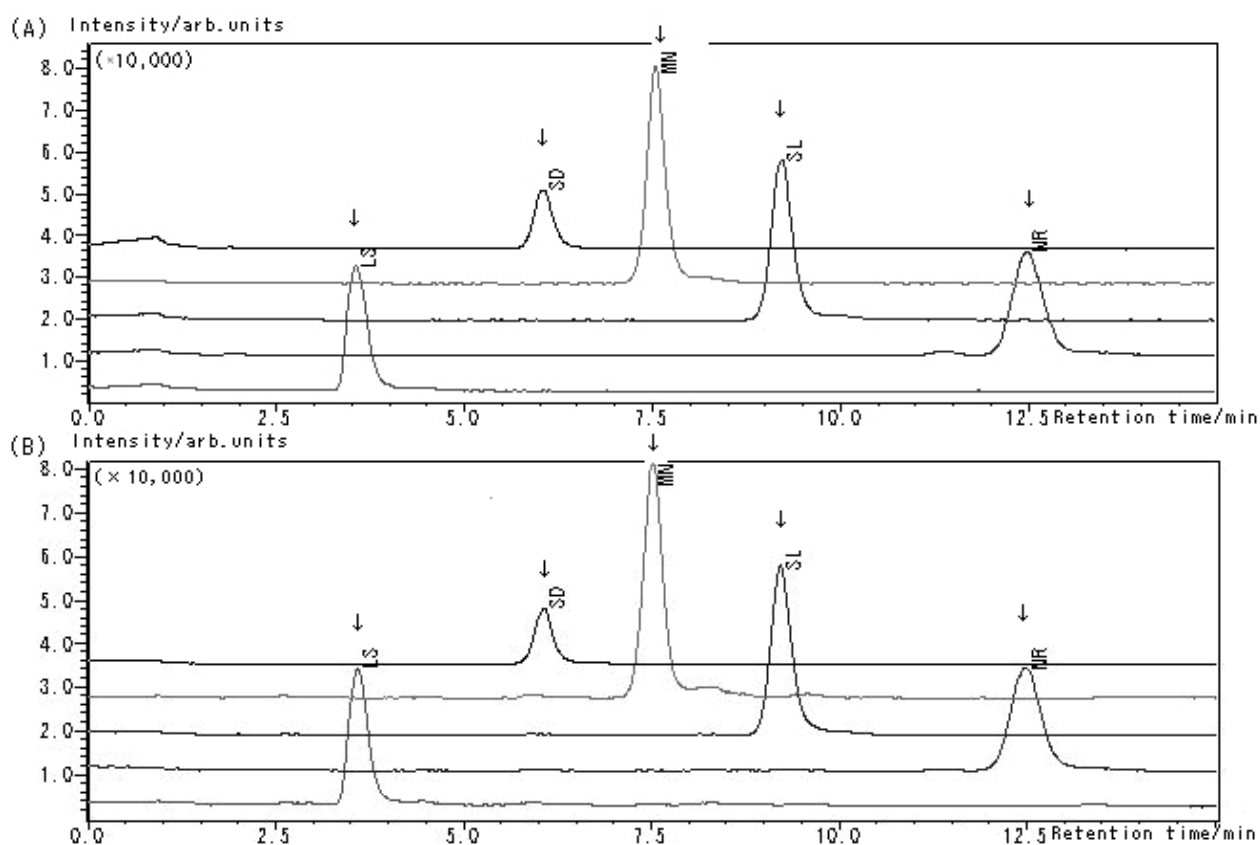
以上の結果から、本法は、既存のバイオオートグラフ法の検出下限である試料中0.5 g(力価)/t相当量を検出可能であると考えられた。

**Table 6 Recovery tests in formula feeds**

Added level (g(potency)/ton)	Kind of antibiotic	Kind of formula feeds (%)					
		for layer		for finishing pig		for beef cattle	
		Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
5	LS	91.6	( 2.8)	91.4	( 1.4)	85.2	( 3.8)
	SD	89.5	( 0.7)	84.6	( 0.9)	88.7	( 1.4)
	MN	104	( 1.5)	105	( 0.8)	108	( 1.1)
	SL	96.2	( 1.9)	98.4	( 2.0)	98.8	( 1.3)
	NR	86.8	( 1.6)	88.3	( 2.3)	89.7	( 3.6)
0.5	LS	94.5	( 2.1)	86.0	( 4.5)	89.4	( 2.1)
	SD	89.4	( 1.2)	80.0	(10 )	90.0	( 3.9)
	MN	109	( 1.1)	104	( 0.9)	104	( 0.5)
	SL	95.0	( 2.4)	95.5	( 2.3)	89.7	( 2.9)
	NR	88.9	( 7.6)	83.0	( 6.6)	83.4	(13 )

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation

**Fig. 3 SIM chromatograms of standard solution and sample solution**

LC-MS conditions are shown in Table 2.

(A) Mixed standard solution (The amount of each antibiotics are 0.6 ng(potency))

(B) Sample solution of formula feed for layer (added each antibiotics at 0.5 g(potency)/t)



### 3.8 共同試験

本法の再現精度を調査するため、成鶏飼育用配合飼料にサリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムとして各 0.5 g(力価)/t 相当量を添加した共通試料を用いて、株式会社島津製作所分析計測事業部応用技術部、アジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンター、全国酪農業協同組合連合会分析センター、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同仙台センター及び同神戸センター大阪事務所（8 試験室）において、本法に従って共同分析を実施した。

その結果、Table 7 のとおり、成鶏飼育用配合飼料中のサリノマイシンナトリウムの平均回収率は 95.0%，その繰返し精度及び室間再現精度は、相対標準偏差（ $RSD_r$  及び  $RSD_R$ ）としてそれぞれ 2.7%及び 6.4%であり、HorRat は 0.36 であった。センデュラマイシンナトリウムの平均回収率は 98.6%，その繰返し精度及び室間再現精度は、 $RSD_r$  及び  $RSD_R$  としてそれぞれ 2.6%及び 8.0%であり、HorRat は 0.45 であった。ナラシンの平均回収率は 88.5%，その繰返し精度及び室間再現精度は、 $RSD_r$  及び  $RSD_R$  としてそれぞれ 3.5%及び 5.7%であり、HorRat は 0.31 であった。モネンシンナトリウムの平均回収率は 101%，その繰返し精度及び室間再現精度は、 $RSD_r$  及び  $RSD_R$  としてそれぞれ 3.6%及び 5.0%であり、HorRat は 0.28 であった。ラサロシドナトリウムの平均回収率は 93.3%，その繰返し精度及び室間再現精度は、 $RSD_r$  及び  $RSD_R$  としてそれぞれ 3.8%及び 8.2%であり、HorRat は 0.46 であった。

ここで、HorRat がすべて 0.5 を下回っていることについては、本法は飼料分析基準に記載されているバイオオートグラフによる微生物学的定量法を基に検討したことから、本法が既存の定量法と類似した分析操作になっており、各試験室が操作に習熟していることが原因の一つと考えられた。

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

**Table 7 Collaborative study results**

Lab. No.	(μg/kg)					
	SL <sup>a)</sup>		SD <sup>a)</sup>		NR <sup>a)</sup>	
1	532	486	465	426	465	468
2	480	480	489	488	464	482
3	437	425	504	491	415	444
4	497	499	530	518	439	441
5	511	504	441	427	460	426
6	467	477	487	479	436	462
7	449	442	529	550	394	406
8	461	451	534	527	425	451
Mean value <sup>b)</sup> (μg/kg)	475		493		442	
Recovery <sup>b)</sup> (%)	95.0		98.6		88.5	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	2.7		2.6		3.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	6.4		8.0		5.7	
HorRat	0.36		0.45		0.31	

Lab. No.	MN <sup>a)</sup>			
	MN <sup>a)</sup>		LS <sup>a)</sup>	
1	510	522	504	466
2	500	556	478	496
3	501	485	409	401
4	530	533	487	458
5	524	490	451	402
6	501	491	476	470
7	506	504	523	516
8	477	452	464	466
Mean value <sup>b)</sup> (μg/kg)	505		467	
Recovery <sup>b)</sup> (%)	101		93.3	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	3.6		3.8	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	5.0		8.2	
HorRat	0.28		0.46	

a) Added at 500 μg/kg

b) n=16

c) Relative standard deviation of repeatability

d) Relative standard deviation of reproducibility between different laboratories

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

Lab. No.	Instrument	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 5 μm)
2	Waters micromass Quattro Micro	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 3.5 μm)
3	Waters micromass Quattro Micro	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP Aqua (2.0×150 mm, 5 μm)
4	Shimadzu LCMS-2010EV	Phenomenex Gemini 5 μ C18 110 Å (2.0×150 mm, 5 μm)
5	Agilent Technologies Agilent 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)
6	Agilent Technologies Agilent 1100Series LC/MSD	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (2.0×50 mm, 3 μm)
7	Shimadzu LCMS-2010EV	Phenomenex Gemini 5 μ C18 110 Å (2.0×150 mm, 5 μm)
8	Agilent Technologies Agilent 6140	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 3.5 μm)

#### 4 まとめ

配合飼料中に残留しているサリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムの一斉微量定量法について、液体クロマトグラフ質量分析法を検討したところ、次の結果が得られた。

- 1) イオン化法としてエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード) , モニターイオンとして、サリノマイシン、センデュラマイシン、ナラシン、モネンシン及びラサロシドについて、それぞれ  $m/z$  769, 891, 783, 688 及び 608 (すべてアンモニウム付加イオン  $[M+NH_4]^+$ ) を適用したところ良好に測定が可能であった。
- 2) 溶離液としてアセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (4+1) を適用したところ良好に測定が可能であった。
- 3) 検量線は 0.5~10 ng(力価)の範囲で直線性を示した。
- 4) シリカゲルミニカラムを用いて精製を行う場合の洗浄液にヘキサン-酢酸エチル (9+1) , 溶出液にヘキサン-エタノール (4+1) 15 mL を用いたところ良好に測定が可能であった。
- 5) 試料採取量は、検討の結果 10.0 g を採用することにした。
- 6) 現在、サリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウム以外に飼料添加物に指定されている抗生物質 14 種類及び合成抗菌剤 7 種類並びに配合飼料 9 種類について、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。
- 7) 本法による添加回収試験を実施した結果、サリノマイシンナトリウムについては、平均回収率 89.7~98.8% , その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 2.9%以下、センデュラマイシンナトリウムについては、平均回収率 80.0~90.0% , その繰返し精度は、RSD として 10%以下、ナラシンについては、平均回収率 83.0~89.7% , その繰返し精度は、RSD として 13%以下、モネンシンナ

トリウムについては、平均回収率 104~109%、その繰返し精度は、RSD として 1.5%以下、ラサロシドナトリウムについては、平均回収率 85.2~94.5%、その繰返し精度は、RSD として 4.5%以下の成績が得られた。

- 8) 本法により、配合飼料中に残留したサリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムについて、それぞれ 0.5 g(力価)/t 相当量を検出可能であった。
- 9) 成鶏飼育用配合飼料にサリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムとして各 0.5 g(力価)/t 相当量を添加した共通試料を用いて、8 試験室で共同分析を実施した。

その結果、成鶏飼育用配合飼料のサリノマイシンナトリウムの平均回収率は 95.0%、その繰返し精度及び室間再現精度は、相対標準偏差 ( $RSD_r$  及び  $RSD_R$ ) としてそれぞれ 2.7%及び 6.4%であり、HorRat は 0.36 であった。センデュラマイシンナトリウムの平均回収率は 98.6%、その繰返し精度及び室間再現精度は、 $RSD_r$  及び  $RSD_R$  としてそれぞれ 2.6%及び 8.0%であり、HorRat は 0.45 であった。ナラシンの平均回収率は 88.5%、その繰返し精度及び室間再現精度は、 $RSD_r$  及び  $RSD_R$  としてそれぞれ 3.5%及び 5.7%であり、HorRat は 0.31 であった。モネンシンナトリウムの平均回収率は 101%、その繰返し精度及び室間再現精度は、 $RSD_r$  及び  $RSD_R$  としてそれぞれ 3.6%及び 5.0%であり、HorRat は 0.28 であった。ラサロシドナトリウムの平均回収率は 93.3%、その繰返し精度及び室間再現精度は、 $RSD_r$  及び  $RSD_R$  としてそれぞれ 3.8%及び 8.2%であり、HorRat は 0.46 であった。

なお、本法は、平成 20 年 4 月 1 日付けで制定された飼料分析基準<sup>16)</sup>に収載された。

## 謝 辞

試験に際し、助言いただいた株式会社島津製作所分析計測事業部応用技術部京都カスタマーサポートセンターLC-MS 担当村田英明氏に感謝の意を表します。

また、共同試験に参加して頂いた株式会社島津製作所、アジレント・テクノロジー株式会社、全国酪農業協同組合連合会、社団法人日本科学飼料協会及び財団法人日本食品分析センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 農林省告示：“飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律の規定に基づき飼料添加物を定める件”，昭和 51 年 7 月 24 日，告示第 750 号 (1976).
- 2) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，省令第 35 号 (1976).
- 3) 安倍豊子，河野敏威：飼料研究報告，6，122 (1980).
- 4) 草間豊子，寫田秀一：飼料研究報告，11，124 (1986).
- 5) 山谷昭一：飼料研究報告，19，155 (1994).
- 6) 千原哲夫：飼料研究報告，27，80 (2002).
- 7) 安倍豊子，河野敏威：飼料研究報告，6，114 (1980).
- 8) 草間豊子：飼料研究報告，11，107 (1986).
- 9) 菅野 清：畜産の研究，37，5，8 (1983).

- 10) 白戸綾子, 小山敬之: 飼料研究報告, **16**, 172 (1991).
- 11) 早川俊明, 舟津正人: 飼料研究報告, **26**, 51 (2001).
- 12) 小林郁美: 飼料研究報告, **27**, 71 (2002).
- 13) 千原哲夫: 飼料研究報告, **27**, 94 (2002).
- 14) 早川俊明, 牧野大作: 飼料研究報告, **26**, 60 (2001).
- 15) 小野雄造, 野口 淳: 飼料研究報告, **24**, 91 (1999).
- 16) 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).
- 17) 小山敬之: 飼料研究報告, **17**, 96 (1992).
- 18) Blanchflower W. J., Kennedy D. G.: J. Chromatogr. B, **675**, 225 (1996).
- 19) Turnipseed S. B., Roybal J. E., Pfenning A. P.: J. of AOAC Int., **84**, 640 (2001).

## 7 メライザキットによる飼料中の反すう動物由来たん白質の検出法

関口 好浩\*, 草間 豊子\*

### Assessment of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit Detecting Ruminant Protein in Pork Meat and Bone Meals

Yoshihiro SEKIGUCHI\* and Toyoko KUSAMA\*

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

After the detection of the first case of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in 2001, the use of animal protein for production of animal feed was prohibited in Japan. However, since April 2005 the use of meat and bone meal (MBM) of pig origin (pork MBM) and MBM of pig and chicken origin (pork and chicken MBM) has been allowed for the production of some animal feeds. The Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) is engaged in the analysis of feed samples for presence of animal protein using three methods: polymerase chain reaction (PCR) method that detects animal origin DNA; microscopic method that detects MBM directly; and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) methods that detect animal origin protein. Commercially available ELISA kits use polyclonal antibodies and detect milk and dairy products, which are not prohibited materials. Considering the fact that most pork MBM contains milk and/or dairy products, an ELISA kit that is capable of detecting bovine MBM only and not milk and dairy products was required. We assessed ELISA Technologies' MELISA-TEK, a commercially available ELISA kit that is claimed to be capable of detecting only bovine MBM (and not milk and dairy products). Specificity of MELISA-TEK was assessed by testing 45 feed materials. Good specificity was obtained. MELISA-TEK detected bovine meat meal contained 0.15% in a pork MBM and in a chicken meal respectively. A collaborative study was conducted in 16 laboratories using pork MBM and chicken meal containing bovine meat meal. All laboratories detected bovine meat meal contained 0.15% in pork MBM and in chicken meal.

Key words: 牛海綿状脳症 bovine spongiform encephalopathy ; 飼料 feed ; 酵素免疫測定法 ELISA ; モノクローナル抗体 monoclonal antibody ; メライザキット MELISA-TEK ; 反すう動物由来たん白質 ruminant protein ; 牛肉骨粉 bovine meat and bone meal ; 豚肉骨粉 pork meat and bone meal ; チキンミール chicken meal

### 1 緒 言

日本での牛海綿状脳症 (BSE) の発生により, 飼料に用いることのできる動物由来たん白質は種類が限られているところだが, 平成 17 年 4 月 1 日より豚肉骨粉及び豚・鶏原料混合肉骨粉が豚, 鶏及びうずら用の飼料として使用できるようになった<sup>1), 2)</sup>.

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

飼料中の動物由来たん白質の検出法としては、試料を顕微鏡で直接観察する顕微鏡鑑定、動物由来 DNA を検出する PCR 法及び動物由来たん白質を検出する酵素免疫測定法 (ELISA) の 3 つが定められている。ELISA については、平成 18 年 3 月までは ELISA Technologies 製「ELISA-TEK 加工肉種判別キット (牛)」(ELISA-TEK) と森永生科学研究所製「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット」(モリナガキット) のポリクローナル抗体を用いた二つの定性用キットが定められていた<sup>3)</sup>。牛由来たん白質であっても、乳製品については飼料利用が認められているため、代用乳など乳製品を含んだ飼料で飼育された豚がと畜された場合、消化管内に乳製品が残留する可能性がある。これを原料とした豚肉骨粉等を ELISA-TEK 又はモリナガキットで分析すると、牛由来たん白質が検出されることがあり、乳製品には反応しない ELISA キットが必要となった。

ELISA Technologies 製「MELISA-TEK RUMINANT KIT for MEAT & BONE MEALS and ANIMAL FEEDS」(メライザキット) は、骨格筋中の Troponin I (TnI) と特異的に反応するモノクローナル抗体を用いている定性用キットである<sup>4)</sup>。そのため乳、血液、ゼラチン等には反応せず、反すう動物由来肉骨粉のみを検出できると期待されたことから、豚肉骨粉等への適用の可否を検討することとなった。

今回、飼料原料等 45 点を用いて、メライザキットの特異性を確認するとともに、ELISA-TEK とモリナガキットとの比較を行った。また、豚肉骨粉等中の牛肉骨粉の検出下限を調べた。

さらに、メライザキットの再現精度等を明らかにするため、16 試験室による共通試料を用いた共同試験を実施した結果、良好な結果が得られたのでその概要を報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 メライザキット

「MELISA-TEK RUMINANT KIT for MEAT & BONE MEALS and ANIMAL FEEDS」(ELISA Technologies 製) を使用した。

#### 1) 構成

- i 抽出液用バッファー塩 (1 L/包×3 包)
- ii 特定動物種の筋肉組織コントロール (10%) (牛, 豚, 羊各 4 mL)
- iii 抗体固着マイクロウェルモジュール (8 ウェル/ストリップ×12 ストリップ)
- iv 洗浄液用 10 倍濃縮液 (100 mL)
- v ビオチン付抗特定動物種抗体 (2 mL×3)
- vi アビジン-酵素複合体液 (6 mL)
- vii TMB 溶液 (6 mL)
- viii 反応停止液 (6 mL)

キットに添付されている試薬等を Fig. 1 に示した。



Fig. 1 Components of MELISA-TEK (ELISA Technologies, Inc.)

## 2.2 試料

検討に用いた飼料原料及び配混合飼料は、飼料製造業者から入手し、とうもろこし、大麦等の粒状の飼料原料及び配混合飼料は試料約 150 g をミルサーで粒径 1 mm 程度になるまで粉碎し、その他のものは調製せずに用いた。牛由来のものを除く試料は、豚肉骨粉等にあつては反すう動物由来 DNA が含まれていないことを、それ以外のものにあつては牛由来 DNA が含まれていないことを PCR 法により確認したものを用いた。

共同試験に用いた共通試料は以下のように調製した。牛肉を細かく刻み、オートクレーブで 133°C、3 気圧で 30 分間加熱処理した。オートクレーブ処理した牛肉を遠心分離して油分を除去した後、80°C で乾燥しミルサーで粉碎したものを牛肉粉とした。牛由来原料が含まれていない豚肉骨粉及びチキンミールをマトリックスとして選び、これらに牛肉粉を 0.15% 及び 0.75% になるように乳鉢で混合した。2 種類 3 濃度 (0%, 0.15% 及び 0.75%) の共通試料をそれぞれ 250 g 程度調製し、各試料を最低一回分析できる量ずつ小分けした。小分けした試料およそ 50 個の内 8 個を均一性確認用としてランダムに抜き出した。抜き出した試料を MELISA-TEK で反すう動物由来たん白質の有無を確認したところ、牛肉粉添加試料についてはすべて陽性であり、無添加試料についてはすべて陰性であったので、均一性については問題がないとして、各試料をそれぞれランダムに 2 点ずつ各試験室に配布した。

牛肉骨粉添加試料は、オーストラリア産牛肉骨粉を粒径 1 mm まで粉碎したものを乳鉢で豚肉骨粉と混合して使用した。

## 2.2 試薬

### 1) ELISA Technologies 製 MELISA-TEK RUMINANT KIT for MEAT & BONE MEALS and ANIMAL FEEDS

#### i 抽出液

キットに添付されている抽出液用バッファー塩 1 包を蒸留水 1 L に溶かして抽出液とした。

#### ii 陰性コントロール液

キットに添付されている特定動物種の筋肉組織コントロール (10%) (豚) を用いた。



## iii 0.05%及び1%陽性コントロール液

キットに添付されている特定動物種の筋肉組織コントロール (10%) (牛) 100  $\mu$ L と抽出液 900  $\mu$ L を混合して 1%陽性コントロール液とし, 1%陽性コントロール液 50  $\mu$ L と陰性コントロール液 950  $\mu$ L とを混合して 0.05%陽性コントロール液とした.

## iv 抗体固相化モジュール

キットに添付されている抗体固着マイクロウェルモジュールを用いた.

## v 洗浄液

キットに添付されている洗浄液用 10 倍濃縮液 100 mL と蒸留水 900 mL とを混合して洗浄液とした.

## vi ビオチン化抗体液

キットに添付されているビオチン付抗特定動物種抗体を用いた.

## vii アビジン酵素複合体液

キットに添付されているアビジン-酵素複合体液を用いた.

## viii 基質 TMB 液

キットに添付されている TMB 溶液を用いた.

## ix 反応停止液

キットに添付されている反応停止液を用いた.

## 2) ELISA Technologies 製 ELISA-TEK 加工肉種判別キット (牛)

## 3) 森永生科学研究所製 モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット

## 4) Advanced ImmunoChemical 製 Troponin I, bovine skeletal muscle

0.01 mol/L 塩酸で 5  $\mu$ g/mL に調製した後, マイクロピペットにより抽出液で段階希釈を行った.

## 2.3 装置及び器具

- |                      |   |
|----------------------|---|
| 1) ミルサー              | : 岩谷産業製 IFM-300DG                         |
| 2) オートクレーブ           | : アルプ製 IT-2322                            |
| 3) 乾燥機               | : 東洋製作所製 FC-612                           |
| 4) 振とう機              | : タイテック製 RECIPRO SHAKER SR-2W             |
| 5) 遠心分離器             | : トミー精工製 MX-300                           |
| 6) マイクロプレートリーダー      | : TECAN 製 Sunrise Rainbow Thermo          |
| 7) プレートウォッシャー        | : ファスマック製 簡易型 96 穴プレート洗浄器                 |
| 8) シングルチャンネルマイクロピペット | : BIOHIT 製 m1000 (100~1000 $\mu$ L)       |
| 9) 8 チャンネルマイクロピペット   | : Eppendorf 製 Research M (30~300 $\mu$ L) |

## 2.4 試験方法

## 1) メライザキットの試験方法

## i 抽出

分析試料約 150 g をミルサーで粉砕した後, その 5.0 g を量って三角フラスコに入れ, 抽出液 50 mL を加え 20 分間振り混ぜて抽出した. これを水浴中で 15 分間加熱した後放冷し, 3,300 rpm (1,000 $\times$ g) で 5 分間遠心分離し, ろ紙 (5 種 A) でろ過した. ろ液をさらに 10,500 rpm (10,000 $\times$ g) で 10 分間遠心分離し, 上澄み液を ELISA 操作に供する試料溶液とした.

## ii ELISA 操作

試料溶液, 0.05%及び 1%陽性コントロール液, 陰性コントロール液及び抽出液 (ブランク液とした.) 各 100  $\mu$ L を, 抗体固相化モジュールにそれぞれ 2 ウェルずつ入れ, 室温で 20 分間反応させた. ウェル内の液を完全に除去し, 洗浄液 300  $\mu$ L を各ウェルに加えて 4 回洗浄した.

次に, ビオチン化抗体液 50  $\mu$ L ずつを各ウェルに加えて, 室温で 20 分間反応させた後, ウェル内の液を完全に除去し, 洗浄液 300  $\mu$ L を各ウェルに加えて 4 回洗浄した.

次に, アビジン酵素複合体液 50  $\mu$ L ずつを各ウェルに加えて, 室温で 20 分間反応させた後, ウェル内の液を完全に除去し, 洗浄液 300  $\mu$ L を各ウェルに加えて 8 回洗浄した.

次に, 基質 TMB 液 50  $\mu$ L ずつを各ウェルに加えて, 室温で 20 分間反応させた後, 反応停止液 50  $\mu$ L ずつを各ウェルに加えて酵素反応を停止させて, 15 分以内に各ウェルの 450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し, 各ウェルの吸光度値からブランク液の吸光度の平均値を差し引いた値を測定値とした.

## iii 試験成立条件

1%陽性コントロール液の測定値の平均値が 1.000 以上であり, 陰性コントロール液の測定値の平均値が 0.100 未満であり, かつ 0.05%陽性コントロール液の測定値の標準偏差が 0.100 以下である場合に試験成立とした.

## iv 判定

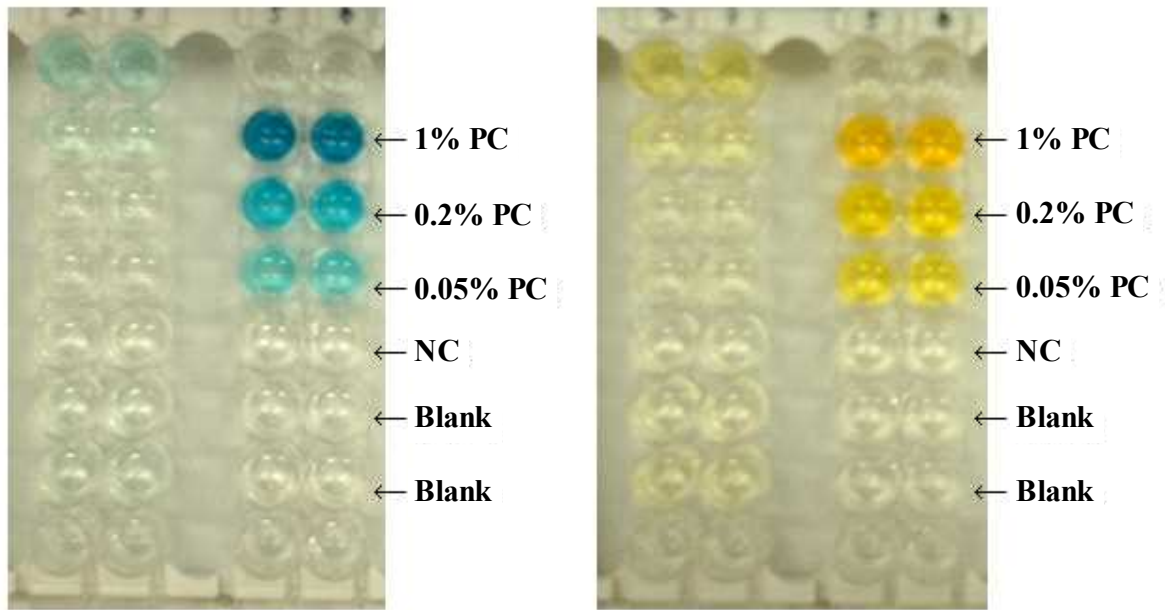
試料溶液の測定値の平均値が 0.100 以上であり, かつ陰性コントロール液の測定値の 2 倍以上であった場合を反すう動物由来たん白質を検出とし, それ以外を不検出と判定した.

試験方法の概要を Scheme に, 反応停止液添加前後の図を参考として Fig. 2 に示した.

## 2) ELISA-TEK 及びモリナガキットの試験方法

ELISA による飼料中の動物由来たん白質の検出法<sup>3), 5)</sup> (平成 20 年 4 月 1 日付けで飼料分析基準に収載<sup>6)</sup>) に基づき実施した.

なお, 一部の試料において抽出液をすべて吸収してしまい, 試料溶液の採取が困難なものがあつたが, これらについては試料採取量又は抽出液量を変更することにより抽出を行った.



(A) Before adding stop solution

(B) After adding stop solution

**Fig. 2 Result of MELISA-TEK**

PC : positive control, NC : negative control, Blank : Extraction solution

Sample 5.0 g

- add 50 mL of Extraction Solution
- shake for 20 minutes
- heat in a water bath for 15 minutes
- allow to cool
- centrifuge for 5 minutes at 1,000×g
- filtrate with filter paper (No.5A)
- centrifuge for 10 minutes at 10,000×g

ELISA

- add 100 μL of sample supernatants, 0.05% and 1% positive controls, negative control and extraction solution (as blank solution) into the antibody coated microwell module
- stand for 20 minutes at room temperature
- wash the wells 4 times using Wash Solution
- add 50 μL of Biotinylated Secondary Antibody into each well
- stand for 20 minutes at room temperature
- wash the wells 4 times using Wash Solution
- add 50 μL of Avidin-Peroxidase into each well
- stand for 20 minutes at room temperature
- wash the wells 8 times using Wash Solution
- add 50 μL of TMB Substrate into each well
- stand for 20 minutes at room temperature
- add 50 μL of Stop Solution into each well

Microplate reader (450 nm)

**Scheme Procedure of MELISA-TEK assay**

### 3 結果及び考察

#### 3.1 特異性確認

植物性飼料原料 22 点，動物性飼料原料（反すう動物由来原料を含まないもの）19 点，牛用配混合飼料（反すう動物由来原料を含まないもの）2 点，乳製品 2 点及び牛肉骨粉を用いてメライザキットにより試験を行い，その特異性を確認した．また，同一の試料について ELISA-TEK 及びモリナガキットにより試験を行い比較した結果を Table 1 に示した．

メライザキットでは，植物性飼料原料並びに魚粉，豚肉骨粉及びチキンミール等の反すう動物以外の動物性飼料原料は，すべて陰性であった．また，牛肉骨粉で反すう動物由来たん白質が検出されたが，乳製品である脱脂粉乳及び乾燥ホエーについては検出されず，骨格筋由来のモノクローナル抗体による特異性の高さが確認できた．

ELISA-TEK では，マイロで偽陽性となり，乳製品のうちの乾燥ホエーが陽性であった．モリナガキットは偽陽性となる試料が多く，エクспанダー処理トウモロコシ，ナタネ，ナタネ油かす及び豚由来の飼料原料（豚肉粉，豚肉骨粉及び鶏・豚原料混合肉骨粉）12 点ではすべて偽陽性であった．また，飼料に使用可能な乳製品はいずれも検出された．

したがって，各種飼料に対する特異性はメライザキットが最も良く，豚肉骨粉中の反すう動物由来たん白質の検出には，メライザキットを用いることが適当と考えられた．

#### 3.2 検出下限

メライザキットの検出下限を調べるため，豚肉骨粉及びチキンミールにそれぞれ牛肉粉を 0.15%及び 0.75%添加した試料を調製し，メライザキットで試験を行った．その結果は Table 2 のとおりであった．

豚肉骨粉及びチキンミールのどちらについても 0.15%以上の牛肉粉を検出できた．牛肉粉 0.15%添加試料の O.D.は，メライザキットのカットオフ値（反すう動物由来たん白質検出の判定基準となる閾値で 0.1.）と比べると豚肉骨粉が 0.394，チキンミールが 1.566 とかなり高い値であることから，0.15%よりも低い牛肉粉添加量でも検出可能と考えられた．なお，牛肉粉添加量が同じでも豚肉骨粉に比べチキンミールの方が，O.D.が高い結果が得られたが，これについてはマトリックスの影響によるものと考えられた．

**Table 1 Specificity of various feed materials and bovine meat and bone meal (bovine MBM) using MELISA-TEK assay<sup>1)</sup>**

No.	Sample	(+/−: Detected/Not detected)					
		MELISA-TEK		ELISA-TEK <sup>2)</sup>		Morinaga <sup>3)</sup>	
		Result	O.D. <sup>4)</sup>	Result	O.D. <sup>5)</sup>	Result	O.D. <sup>6)</sup>
1	Corn, flaked	−	-0.003	−	0.022	−	0.024
2	expanded	−	0.025	−	0.029	+	0.098
3	Barley, flaked	−	-0.002	−	0.021	−	0.028
4	Wheat bran	−	-0.002	−	0.026	−	0.014
5	Rapeseed	−	0.001	−	0.021	+	0.055
6	Rapeseed meal	−	0.004	−	0.022	+	0.165
7	Soybean meal, dehulled	−	0.000	−	0.022	−	0.029
8	Soy sauce cake	−	0.002	−	0.023	−	0.025
9	Toasted soybean flour	−	0.002	−	0.022	−	0.016
10	Soybean, flaked	−	0.001	−	0.022	−	0.017
11	Soybean curd residue	−	-0.003	−	0.019	−	0.019
12	Beet pulp	−	0.000	−	0.021	−	0.029
13	Cotton seed	−	0.011	−	0.040	−	0.025
14	Rice bran	−	0.003	−	0.040	−	0.029
15	Corn gluten meal	−	0.000	−	0.023	−	0.047
16	Gluten feed	−	0.001	−	0.022	−	0.020
17	Grain sorghum	−	0.001	+	0.149	−	0.012
18	Cacao husk	−	-0.003	−	0.022	−	0.023
19	Palm kernel meal	−	0.002	−	0.023	−	0.019
20	Dry brewers grain	−	0.001	−	0.023	−	0.017
21	Paprika extract	−	0.000	−	0.020	−	0.021
22	Dextrin	−	-0.002	−	0.017	−	0.018
23	Mixed feed	−	-0.001	−	0.017	−	0.021
24	Formula feed	−	0.000	−	0.021	−	0.013
25	Crab meal	−	0.000	−	0.018	−	0.015
26	Fish meal	−	-0.001	−	0.017	−	0.019
27	Shell meal	−	-0.001	−	0.021	−	0.018
28	Pork meat meal	−	-0.002	−	0.021	+	0.055
29	Pork MBM 1	−	0.025	−	0.022	+	0.086
30	2	−	-0.004	−	0.019	+	0.042
31	3	−	0.022	−	0.023	+	0.080
32	4	−	0.011	−	0.023	+	0.141
33	Pork and chicken meal	−	-0.003	−	0.022	+	0.045
34	Pork and chicken MBM 1	−	-0.005	−	0.022	+	0.053
35	2	−	-0.005	−	0.018	+	0.042
36	3	−	-0.005	−	0.020	+	0.080
37	4	−	0.003	−	0.022	+	0.141
38	5	−	0.053	−	0.024	+	0.154
39	6	−	-0.001	−	0.021	+	0.075
40	Chicken meal 1	−	-0.001	−	0.022	−	0.031
41	2	−	-0.001	−	0.022	−	0.026
42	Feather meal 1	−	0.002	−	0.028	−	0.043
43	2	−	-0.002	−	0.021	−	0.044
44	Dried skim milk	−	0.000	−	0.110	+	0.695
45	Dried whey	−	-0.001	+	0.240	+	1.155
46	Bovine MBM	+	1.198	+	0.355	+	1.607

1)  $n=2$  (No. 1~43),  $n=1$  (No. 44~46).

2) Product of ELISA Technologies, Inc.

3) Morinaga ELISA kit against a heat-treated bovine protein is a product of Morinaga Institute of Biological Science, Inc.

4) Cut-off value is O.D. 0.1.

5) Cut-off values are O.D. 0.126 for No. 1~10 and 12~21, 0.160 for No. 5, 42 and 43, 0.151 for 22~41, 0.144 for No.44 and 45, 0.082 for No. 46.

6) Cut-off values are O.D. 0.066 for No. 1~3, 6, 7, and 12~15, 0.034 for No. 4, 8, 9 and 16~21, 0.032 for No. 5, 10~11 and 22~27, 0.027 for No. 28~31, 33~36, 0.075 for No. 32, 37~43, 0.075 for No. 44~46.

7) Equivalent to a concentration of 1% bovine MBM in a sample.

8) Equivalent to a concentration of 10% bovine MBM in a sample.

**Table 2 Results of MELISA-TEK assay on Pork MBM and Chicken Meal containing Bovine Meat Meal at different levels<sup>1)</sup>**

Contamination level of bovine meat meal	Pork MBM			Chicken Meal		
	Result	Mean O.D.	S.D. <sup>2)</sup>	Result	Mean O.D.	S.D. <sup>2)</sup>
0%	—	-0.001	0.001	—	0.001	0.003
0.15%	+	0.394	0.041	+	1.566	0.166
0.75%	+	2.249	0.197	+	3.487	0.045

1)  $n=8$

2) Standard Deviation

### 3.3 共同試験

メライザキットによる試験法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。豚肉骨粉及びチキンミールに牛肉粉を 0.15%及び 0.75%添加した試料及び無添加試料を用い、協同飼料株式会社品質保証部、財団法人食品環境検査協会東京事業所、財団法人日本食品分析センター千歳研究所、財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター、社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター、社団法人日本科学飼料協会、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、全国酪農業協同組合連合会分析センター、日本配合飼料株式会社中央研究所、農林水産省動物検疫所、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部、同札幌事務所（現 同札幌センター）、同仙台事務所（現 同仙台センター）、同名古屋事務所（現 同名古屋センター）、同大阪事務所（現 同神戸センター大阪事務所及び同福岡事務所（現 同福岡センター））の 16 試験室において、本法に従って共同試験を実施した。

その結果は Table 3 のとおりで、すべての試験室がすべての試料について反すう動物由来たん白質の有無を正しく判定でき、特異性、感度、Accordance 及び Concordance はすべて 100%、COR もすべて 1 という良い結果が得られた。

検出下限の検討では 0.15%より低い牛肉粉添加量でも検出可能と考えられたが、牛肉粉 0.15%添加豚肉骨粉では 16 試験室の O.D.の最小値が 0.103 とカットオフ値 (0.1) よりわずかに大きい値であったことから、試験室間のバラツキも考慮したメライザキットの検出下限は 0.15%程度と考えられた。

なお、Accordance, Concordance 及び COR は、Langton により提唱された定性分析の共同分析結果の新たな精度指標<sup>7)</sup>であり、Accordance が試験室内の結果の一致度を、Concordance が試験室間の一致度を意味し、それぞれ定量分析における室内繰返し精度と室間再現精度にあたる。Accordance 及び Concordance は 100%に近いほど精度が高く、COR は Accordance 及び Concordance が定性分析の感度により影響を受けやすいことから、それに影響を受けにくい指標となっており、1 に近い値ほど精度が高い。

参考のため、各試験室で使用したプレートウォッシャーとプレートリーダーの機種等を Table 4 に示した。

**Table 3 Collaborative study results of MELISA-TEK assay**

(+/-: Detected/Not detected)

Lab. No.	Contamination level of bovine meat meal					
	Pork meat and bone meal			Chicken meal		
	0%	0.15%	0.75%	0%	0.15%	0.75%
1	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
2	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
3	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
4	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
5	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
6	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
7	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
8	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
9	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
10	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
11	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
12	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
13	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
14	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
15	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
16	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
Specificity (%)	100	—	—	100	—	—
Sensitivity (%)	—	100	100	—	100	100
Accordance (%)	100	100	100	100	100	100
Concordance (%)	100	100	100	100	100	100
COR	1	1	1	1	1	1
O.D. Mean	0.002	0.250	1.195	-0.001	0.908	2.637
Min	-0.011	0.103	0.548	-0.010	0.211	0.930
Max	0.016	0.622	2.266	0.006	1.608	3.547

**Table 4 Instruments used in the collaborative study**

Lab. No.	Plate washer	Microplate reader
1	— <sup>*1</sup>	Molecular Devices Vmax KINETIC MICROPLATE READER
2	— <sup>*2</sup>	Nalge Nunc International IMMUNO-MINI NJ-2300
3	— <sup>*2</sup>	TOSOH MPR-A4i
4	— <sup>*2</sup>	BIO-RAD Benchmark Plus
5	— <sup>*2</sup>	BIO-RAD Model 550
6	— <sup>*2</sup>	BIO-RAD Benchmark Plus
7	BIO-RAD Immunowash Model 1575	TECAN SUNRISE RAINBOW
8	TRICONTINENT MultiWash II	Molecular Devices VERSA max
9	BIO-RAD Immunowash Model 1575	BIO-RAD Model 550
10	— <sup>*2</sup>	Thermo Labsystems Multiskan JX and COLONA ELECTRIC MTP-120
11	Thermo labsystems Wellwash 4MK2	TECAN SUNRISE CLASSIC
12	Thermo labsystems Wellwash 4MK2	TECAN SUNRISE CLASSIC
13	— <sup>*3</sup>	TECAN SUNRISE RAINBOW THERMO
14	Thermo labsystems Wellwash 4MK2	TECAN SUNRISE CLASSIC
15	Thermo labsystems Wellwash 4MK2	TECAN SUNRISE CLASSIC
16	Thermo labsystems Wellwash 4MK2	TECAN SUNRISE CLASSIC

<sup>\*1</sup> Wash using a washing bottle.

<sup>\*2</sup> Wash using a multichannel micropipette.

<sup>\*3</sup> Wash using a multichannel dispenser.

### 3.4 流通豚肉骨粉中の牛肉骨粉の検出

メライザキットは、Myers らにより配合飼料中の牛肉骨粉について評価がなされており、感度が低いと報告されている<sup>8)</sup>。そこで、国内各種の動物質性飼料（反すう動物由来原料を含まないもの）を用い、牛肉骨粉での検出感度を調べた。豚肉骨粉、原料混合肉骨粉（豚肉骨粉とチキンミールを混合したもの）、チキンミール及びフェザーミールに、それぞれ牛肉骨粉を 0.25%、0.5%及び 1%添加した試料を調製し、メライザキットで試験を行った。



試験の結果は Table 5 のとおりであり、6 試料中 1 試料の 0.25%添加試料を除き、すべて検出することができた。したがって、メライザキットは動物性飼料中の牛肉骨粉の検出法としては、検査分析に適用するのに十分な感度を有していると考えられた。

Chen によると、メライザキットに用いられているモノクローナル抗体は 5.0 ng/mL の TnI を検出できると報告されている<sup>4)</sup>。試験に用いた牛肉骨粉について、メライザキットで TnI の含有量を測定したところおよそ 50 mg/kg であった。したがって、メライザキットは豚肉骨粉等中 0.1% の牛肉骨粉の検出が可能と推測される。

なお、牛肉粉と比較して牛肉骨粉の検出下限が大きい結果となったのは、骨の含有量が多くなるほど TnI 含有量は減少するためと考えられる。

**Table 5 Results of MELISA-TEK assay on six samples of pork MBM containing bovine MBM at different levels**

(n=1; +/-: Detected/Not detected)

Kind of pork MBM	Contamination level of bovine MBM							
	0%		0.25%		0.5%		1%	
	Result	O.D.	Result	O.D.	Result	O.D.	Result	O.D.
Pork meat meal	-	0.017	+	0.104	+	0.225	+	0.427
Pork MBM	-	0.060	+	0.180	+	0.324	+	0.544
Pork and chicken MBM 1	-	0.005	-	0.086	+	0.179	+	0.318
2	-	0.010	+	0.133	+	0.240	+	0.476
Chicken meal	-	0.005	+	0.118	+	0.214	+	0.436
Feather meal	-	0.004	+	0.121	+	0.218	+	0.414

#### 4 まとめ

メライザキットによる飼料中の反すう動物由来たん白質の検出法について検討したところ、次の結果を得た。

- 1) 植物性飼料原料 22 点、反すう動物由来原料を含まない動物性飼料原料 19 点、反すう動物由来原料を含まない牛用配混合飼料 2 点、乳製品 2 点及び牛肉骨粉を用いて試験を行ったところ、乳製品の影響を受けずに牛肉骨粉を特異的に検出することができた。
- 2) 豚肉骨粉及びチキンミールにそれぞれ牛肉粉を 0%、0.15%及び 0.75%添加した試料を用いて検出下限を調べたところ、豚肉骨粉等中の牛肉粉で 0.15%と考えられた。
- 3) 豚肉骨粉及びチキンミールにそれぞれ牛肉粉を 0%、0.15%及び 0.75%添加した試料を用いた共同試験の結果、特異性、感度、Accordance 及び Concordance はすべて 100%、COR もすべて 1 であった。

以上の結果から、メライザキットは豚肉骨粉等の動物性飼料中の反すう動物由来たん白質の検出法として、特異性・検出感度とも検査分析に適用するのに十分な精度を有していると考えられた。

なお、メライザキットは本検討の結果を踏まえて、平成 18 年 3 月 17 日付けで「飼料中の動物由来たん白質の検出法 (その 3)」として制定され<sup>5)</sup>、平成 20 年 4 月 1 日には ELISA-TEK 及びモリナガキットと共に飼料分析基準に収載された<sup>6)</sup>。

## 謝 辞

共同試験にご協力をいただいた協同飼料株式会社品質保証部，財団法人食品環境検査協会東京事業所，財団法人日本食品分析センター千歳研究所，財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター，社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター，社団法人日本科学飼料協会，全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所，全国酪農業協同組合連合会分析センター，日本配合飼料株式会社中央研究所，農林水産省動物検疫所の各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).  
改正 農林水産省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令”，平成 17 年 2 月 28 日，農林省令第 15 号 (2005).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令の施行について”，平成 17 年 3 月 11 日，16 消安第 9573 号 (2005).
- 3) 農林水産省生産局長通知：“飼料中の動物由来たん白質等の検出法について”，平成 14 年 4 月 9 日，14 生畜第 181 号 (2002).
- 4) Chen, F. et al.: *Journal of Food Protection*, **67**, 544-549 (2004).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：“「飼料中の動物由来たん白質等の検出法について」の改正について”，平成 18 年 3 月 17 日，17 消安第 12305 号 (2006).
- 6) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 7) Langton, S.D.: *International Journal of Food Microbiology*, **79**, 175-181 (2002).
- 8) Michael J. Myers, et al.: *Journal of Food Protection*, **70**, 692-699 (2007).

## 技術レポート

## 1 飼料中の粗たん白質の燃焼法による定量法の妥当性確認

八木 寿治<sup>\*1</sup>, 榊原 良成<sup>\*2</sup>, 吉永 晋<sup>\*3</sup>, 福本 裕二<sup>\*2</sup>, 石黒 瑛一<sup>\*4</sup>, 安井 明美<sup>\*5</sup>

### Method Validation for Determination of Crude Protein in Feeds by Combustion Method

Toshiharu YAGI<sup>\*1</sup>, Yoshinari SAKAKIBARA<sup>\*2</sup>, Susumu YOSHINAGA<sup>\*3</sup>, Yuji FUKUMOTO<sup>\*2</sup>,  
Eiichi ISHIKURO<sup>\*4</sup> and Akemi YASUI<sup>\*5</sup>

(<sup>\*1</sup> I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Service, Headquarters

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

<sup>\*2</sup> I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Service, Headquarters

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

<sup>\*3</sup> I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Service, Headquarters

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

<sup>\*4</sup> I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Service, Headquarters (Now Japan Food Research Laboratories),

<sup>\*5</sup> I.A.A. National Agriculture and Food Research Organization National Food Research Institute)

The combustion method was compared with the Kjeldahl method for determination of crude protein in feeds. Three formula feeds and six feed ingredients were analyzed by the combustion method (using two instruments) and the Kjeldahl method (manually and using instruments). The results were subjected to t-test of Welch. A significant difference was observed between the results obtained by the combustion method and those obtained by the Kjeldahl method except for the results obtained for cattle formula feed and poultry formula feed. The mean values on all samples were 32.2% for the combustion method and 31.7% for the Kjeldahl method, indicating the combustion method tends to produce a result slightly higher than the Kjeldahl method. A collaborative study was performed in eleven laboratories to evaluate the reproducibility of the combustion method. The participant laboratories analyzed the aforementioned nine materials combined with hydrochloric acid L-lysine. The relative standard deviations of repeatability and reproducibility (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) were from 0.4 to 1.0%, and from 0.5 to 1.6%, respectively. HorRat was from 0.2 to 0.5.

Key words: 飼料 feed ; 粗たん白質 crude protein ; 燃焼法 combustion method ; ケルダール法 Kjeldahl method ; 共同試験 collaborative study ; 妥当性確認 validation

<sup>\*1</sup> 独立行政法人肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター名古屋センター

<sup>\*2</sup> (独) 肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

<sup>\*3</sup> (独) 肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

<sup>\*4</sup> (独) 肥飼料検査所本部, 現 財団法人日本食品分析センター

<sup>\*5</sup> (独) 農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

## 1 緒 言

現在、飼料中の粗たん白質の定量法として、ケルダール法が広く用いられている。ケルダール法の歴史は古く、100年以上前に開発されて改良が重ねられ、現在ではケルダール法による分解装置と自動蒸留・滴定装置を組み合わせた自動分析装置を使用する方法が一般的である。

燃焼法である Dumas 法は AOAC 11<sup>th</sup> ed<sup>1)</sup>に初めて採用された。AOAC 16<sup>th</sup> ed<sup>2)</sup>では Dumas 法から Combustion 法に名称が変更されるとともに内容も改良され、AOAC 18<sup>th</sup> ed<sup>3)</sup>においては適用範囲は飼料のほか穀類及び油糧種子、肉及び肉製品にも採用されている。また、ISO 法でも Dumas 法に基づく燃焼法が穀類、豆類、粉碎した穀類、油糧種子及び飼料で採用されている<sup>4)</sup>。燃焼法はケルダール法と比較して試料の分解処理時に濃硫酸や硫酸銅等を使用しないため環境への負担が少ない点、装置が使いやすくメンテナンスが容易な点、分析時間が通常 5~10 分と大幅に短縮される点等、優れている点が多い。

諸外国では飼料の分野でも、この燃焼法の普及が進んでおり、国際的な商取引の場においても、この燃焼法のデータを使用することが多くなっている。しかしながら、わが国では燃焼法は上記のような利点を持ちながらも、公定分析法に採用されていなかった。今回、公定分析法として飼料分析基準<sup>5)</sup>への採用の要望が多数寄せられたため、飼料への適用時の燃焼法とケルダール法、両分析法の差異について検討し、同時に、燃焼法による粗たん白質の定量法の妥当性確認も行ったので報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

市販の配合飼料（牛用配合飼料，豚用配合飼料，鶏用配合飼料）及び飼料原料（ふすま，マイロ，大豆油かす，調整魚粉，輸入魚粉，アルファルファヘイ）をそれぞれ全量が 0.5 mm の網ふるいを通過するまで粉碎して用いた。

### 2.2 装 置

Sweeney<sup>6)</sup>によると、燃焼法による粗たん白質定量のための自動分析装置としては次の 1 から 4 の能力を有するものが必要であるとしており、AOAC 18<sup>th</sup> ed<sup>3)</sup>にも同様の記載がされている。

- 1 純粋な（純度 99.9%の）酸素ガス中で試料を熱分解するため、最低 950°C の操作温度を保持できる燃焼炉をもつこと。
- 2 熱伝導検出器による窒素ガスの測定のために、遊離された窒素ガスを他の燃焼生成物から分離できるシステムをもつこと。
- 3 窒素酸化物 (NO<sub>x</sub>) を窒素ガス (N<sub>2</sub>) に変換する機構、あるいは窒素を NO<sub>2</sub> として測定できる機構をもつこと。
- 4 正確さ検定用標準品を用いて繰返し測定したときの窒素量の平均値及び標準偏差が一定 (0.15%以下) の範囲内であること。

そのため、筆者らは、上記の能力を満たす自動分析装置 2 機種 (NC-1000 及び NC-220F, 住化分析センター製) を使用して検討を行った。

一方、ケルダール法による分析については飼料分析基準<sup>5)</sup>のマクロケルダール法の他に、ケルダール自動分析装置 1 機種 (ブロック加熱装置: DK20 型, VELP 製) (蒸留・滴定装置: 1300 型スーパーケル, アクタック製) を使用して検討を行った。

## 2.3 分析方法

燃焼法では、窒素含量に応じて分析試料 100~500 mg を正確に量り、窒素（たん白質）分析装置に入れ、分析装置を作動させ窒素ガスの検出ピークを得た。同時に、検量線作成用試薬として EDTA または DL-アスパラギン酸を正確に量り、装置に入れ、窒素ガスの検出ピークを得た。得られた検出ピークから面積を求めて検量線を作成し、試料中の窒素含量を算出した後、窒素含量に 6.25 を乗じて粗たん白質量（%）を求めた。

マクロケルダール法では分析試料 2 g を、ケルダール自動分析装置では分析試料 1 g をそれぞれ正確に量り分析を行った。

## 3 結果及び考察

### 3.1 燃焼法及びケルダール法による粗たん白質の定量結果

燃焼法による粗たん白質の定量を、自動分析装置 2 機種を用い、各々の試料に対して 10 回繰返し分析を行った。得られた定量値に対して Grubbs の検定によって外れ値を除外した後、平均値及び繰返し精度を求めた（Table 1）。燃焼法の繰返し精度は相対標準偏差（ $RSD_r$ ）として 0.07~0.79%であった。

**Table 1 Quantitative values of crude protein by combustion method**

Sample	Instrument A <sup>a)</sup>					Instrument B <sup>b)</sup>				
	N <sup>c)</sup>	Outliers	Estd. protein (%)	SD (%)	$RSD_r$ (%)	N <sup>c)</sup>	Outliers	Estd. protein (%)	SD (%)	$RSD_r$ (%)
Formula feed for cattle	9	1	13.07	(0.06)	(0.46)	10	0	13.28	(0.04)	(0.31)
Formula feed for swine	10	0	18.81	(0.10)	(0.53)	10	0	18.88	(0.15)	(0.79)
Formula feed for poultry	10	0	18.92	(0.08)	(0.43)	10	0	19.31	(0.10)	(0.50)
Wheat bran	10	0	16.09	(0.06)	(0.40)	8	2	15.97	(0.08)	(0.47)
Grain sorghum	10	0	9.13	(0.06)	(0.62)	9	1	9.16	(0.03)	(0.38)
Soybean meal	10	0	50.27	(0.11)	(0.22)	10	0	49.74	(0.12)	(0.24)
Fish meal (domestic)	10	0	63.45	(0.13)	(0.21)	10	0	62.77	(0.12)	(0.19)
Fish meal (imported)	10	0	68.65	(0.16)	(0.24)	10	0	67.41	(0.04)	(0.07)
Alfalfa hay	10	0	17.97	(0.12)	(0.69)	-	-	-	-	-

a) Model NC-1000

b) Model NC-220F

c) Number of determinations

ケルダール法による粗たん白質の定量は、マクロケルダール法及びケルダール自動分析装置を用い、各々の試料に対して 10 回繰返し分析を行った。得られた定量値に対して Grubbs の検定によって外れ値を除外した後、平均値及び繰返し精度を求めた（Table 2）。ケルダール法の繰返し精度は相対標準偏差（ $RSD_r$ ）として 0.18~1.24%であった。

**Table 2 Quantitative values of crude protein by Kjeldahl method**

Sample	Analysis method C <sup>a)</sup>					Instrument D <sup>b)</sup>				
	N <sup>c)</sup>	Outliers	Estd. protein (%)	SD (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	N <sup>c)</sup>	Outliers	Estd. protein (%)	SD (%)	RSD <sub>r</sub> (%)
Formula feed for cattle	10	0	13.15	(0.10)	(0.78)	10	0	13.23	(0.07)	(0.52)
Formula feed for swine	10	0	18.57	(0.07)	(0.37)	9	1	18.76	(0.03)	(0.18)
Formula feed for poultry	10	0	19.12	(0.12)	(0.64)	10	0	19.09	(0.06)	(0.34)
Wheat bran	10	0	15.82	(0.15)	(0.95)	10	0	15.74	(0.07)	(0.42)
Grain sorghum	10	0	8.97	(0.11)	(1.24)	10	0	9.12	(0.07)	(0.78)
Soybean meal	10	0	48.93	(0.30)	(0.61)	10	0	49.73	(0.16)	(0.32)
Fish meal (domestic)	10	0	61.95	(0.48)	(0.78)	10	0	62.16	(0.26)	(0.42)
Fish meal (imported)	10	0	65.89	(0.66)	(1.00)	10	0	66.57	(0.24)	(0.36)
Alfalfa hay	10	0	17.67	(0.10)	(0.58)	-	-	-	-	-

a) Macro-Kjeldahl method (manual)

b) Model DK20 and 1300 Super Kjel

c) Number of determinations

両方法の繰返し精度の相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub>) を比較したところ、分析精度はほぼ同等であった。

### 3.2 両方法間の比較

Table 1 及び Table 2 の各装置又は方法による定量値をそれぞれプールし、燃焼法及びケルダール法としての平均値を求めて両方法の比較を行った。その結果を Table 3 に示した。

**Table 3 Comparison between the Kjeldahl and combustion methods**

Sample	Combustion	Kjeldahl	Difference
	Mean protein (%)	Mean protein (%)	Comb.-Kjel.(%)
Formula feed for cattle	13.17	13.17	0.00
Formula feed for swine	18.85	18.66	0.19
Formula feed for poultry	19.12	19.10	0.02
Wheat bran	16.04	15.78	0.26
Grain sorghum	9.14	9.07	0.07
Soybean meal	50.00	49.33	0.67
Fish meal (domestic)	63.11	62.05	1.06
Fish meal (imported)	68.03	66.23	1.80
All mean protein (%)	32.18	31.67	0.51

各試料について Welch の *t* 検定を有意水準 5%で行ったところ、牛用配合飼料と鶏用配合飼料以外では両方法間では有意差が認められた。これは主として、通常のケルダール法では試料中の硝酸態窒素分の完全回収ができないが、燃焼法では窒素として定量できるため、その差が現れたものと考えられた。

また、3 種類の配合飼料の中で有意差が認められた豚用配合飼料は、硝酸態窒素を多く含有していると言われている魚粉を多く配合していたためであると考えられた。

次に、燃焼法による粗たん白質の総平均値とケルダール法による総平均値を比較したところ

燃焼法による粗たん白質の総平均値が平均 0.51%高い値が得られた。今回、筆者らが検討に用いた試料の種類と若干異なるので単純な比較はできないが、他の比較検討結果と比較してみると、Sweeney<sup>6)</sup>による結果は平均 0.24%、Sweeney ら<sup>7)</sup>による結果は平均 0.19%、Bicsak<sup>8)</sup>による結果は平均 0.05%といずれも今回の検討結果と同様に燃焼法による定量値がケルダール法による定量値より高い結果となっていた。

以上より、試料の種類にもよるが、燃焼法を用いて粗たん白質の定量値を求めた場合には概して、ケルダール法による定量値よりも大きくなる傾向があるため、別途、硝酸態窒素等の非たん白窒素を差し引く等の対応が必要であることが考えられた。

### 3.3 共同試験

燃焼法による定量法の妥当性を確認するため、共通試料による共同試験を実施した。11 試験室において、国内で販売されている自動分析装置 8 機種を用い、試料は先の検討で用いたものと同じものに、塩酸 L-リジンを加えた計 10 試料を非明示反復して総計 20 試料について、各 3 回測定を行った。得られた試験結果から IUPAC の共同試験のプロトコル<sup>9)</sup>を参考にし、Cochran 及び Grubbs の検定によって外れ値を除外した。結果を Table 4 に示した。

その後、総平均値と繰返し精度及び室間再現精度の相対標準偏差を算出し、修正 Horwitz 式<sup>10)</sup>から HorRat を求めた。これらを試料別に Table 5 にまとめた。

**Table 4 Interlaboratory study results for determination of crude protein in feeds by combustion method**

(%)												
Lab. No.	Formula feed for cattle						Formula feed for swine					
	1	13.2	13.2	13.2	13.2	13.4	13.4	18.8	18.9	19.0	19.1	19.1
2	13.3	13.3	13.4	13.3	13.4	13.3	18.9	19.0	19.0	18.8	19.0	18.8
3	13.3	13.4	13.3	13.3	13.4	13.4	19.0	19.2	19.0	19.2	19.1	19.1
4	13.3	13.4	13.3	13.3	13.3	13.4	19.2	19.0	19.2	18.9	19.2	19.2
5	13.8 <sup>b)</sup>	13.6 <sup>b)</sup>	13.7 <sup>b)</sup>	13.9 <sup>b)</sup>	13.9 <sup>b)</sup>	13.7 <sup>b)</sup>	19.5	19.9	19.7	19.8	19.6	19.7
6	13.7	13.3	13.4	13.4	13.4	13.6	19.3 <sup>a)</sup>	19.0 <sup>a)</sup>	19.9 <sup>a)</sup>	19.6 <sup>a)</sup>	19.5 <sup>a)</sup>	20.0 <sup>a)</sup>
7	13.8	13.8	13.9	13.5	13.4	13.7	19.5 <sup>b)</sup>	20.2 <sup>b)</sup>	20.3 <sup>b)</sup>	20.0 <sup>b)</sup>	20.0 <sup>b)</sup>	20.1 <sup>b)</sup>
8	13.2	13.4	13.3	13.2	13.3	13.3	19.1	19.2	19.0	18.9	19.1	19.2
9	13.2 <sup>a)</sup>	13.4 <sup>a)</sup>	13.5 <sup>a)</sup>	15.9 <sup>a)</sup>	13.5 <sup>a)</sup>	13.5 <sup>a)</sup>	18.8	19.1	18.8	19.2	19.2	19.1
10	13.2	13.3	13.4	13.2	13.2	13.4	19.0	19.1	19.1	18.9	19.0	19.1
11	13.6	13.6	13.6	13.4	13.5	13.5	19.4	19.3	19.2	19.1	19.2	19.4

Lab. No.	Formula feed for poultry						Wheat bran					
	1	19.3	19.4	19.4	19.3	19.4	19.4	15.9	15.9	16.0	15.7	16.0
2	19.3	19.4	19.3	19.3	19.3	19.3	15.9	16.1	16.1	16.0	16.0	15.9
3	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5	19.4	16.1	16.1	16.2	16.2	16.1	16.3
4	19.7	19.5	19.4	19.4	19.4	19.6	16.0	16.0	16.2	16.0	16.2	16.1
5	19.9 <sup>b)</sup>	20.2 <sup>b)</sup>	20.0 <sup>b)</sup>	20.0 <sup>b)</sup>	20.0 <sup>b)</sup>	19.9 <sup>b)</sup>	16.8 <sup>b)</sup>	16.7 <sup>b)</sup>	16.7 <sup>b)</sup>	16.5 <sup>b)</sup>	16.6 <sup>b)</sup>	16.5 <sup>b)</sup>
6	19.7	19.4	19.8	19.7	19.8	19.6	16.5	16.2	16.6	16.4	16.3	16.3
7	20.2 <sup>b)</sup>	20.4 <sup>b)</sup>	20.2 <sup>b)</sup>	20.4 <sup>b)</sup>	20.1 <sup>b)</sup>	20.6 <sup>b)</sup>	17.4 <sup>a)</sup>	16.6 <sup>a)</sup>	17.3 <sup>a)</sup>	17.5 <sup>a)</sup>	18.1 <sup>a)</sup>	17.5 <sup>a)</sup>
8	19.2	19.2	19.2	18.8	19.2	19.2	16.1	15.7	15.7	15.8	15.8	15.4
9	19.5	19.4	19.5	19.9	19.2	19.6	16.1	16.2	16.2	16.0	16.3	16.3
10	19.4	19.3	19.4	19.4	19.3	19.5	15.9	16.0	16.1	16.0	16.0	16.2
11	19.4	19.6	19.6	19.5	19.6	19.6	16.2	16.2	16.3	16.1	16.1	16.2

Lab. No.	Grain sorghum						Soybean meal					
	1	9.2	9.1	9.3	9.2	9.3	9.3	50.2	50.0	50.0	49.7	50.0
2	9.1	9.3	9.2	9.2	9.2	9.2	49.9	50.3	50.1	49.9	49.9	50.0
3	9.3	9.3	9.4	9.4	9.4	9.3	50.0	49.9	50.0	49.8	50.2	49.9
4	9.2	9.1	9.2	9.3	9.3	9.3	50.4	50.4	50.4	50.4	50.3	50.2
5	9.6 <sup>b)</sup>	9.8 <sup>b)</sup>	9.8 <sup>b)</sup>	9.7 <sup>b)</sup>	9.7 <sup>b)</sup>	9.4 <sup>b)</sup>	50.7 <sup>b)</sup>	51.1 <sup>b)</sup>	50.9 <sup>b)</sup>	51.1 <sup>b)</sup>	51.0 <sup>b)</sup>	50.6 <sup>b)</sup>
6	9.5	9.3	9.3	9.4	9.4	9.6	50.3	49.8	50.6	50.1	49.7	50.1
7	9.8 <sup>a)</sup>	10.4 <sup>a)</sup>	10.6 <sup>a)</sup>	10.1 <sup>a)</sup>	10.1 <sup>a)</sup>	10.3 <sup>a)</sup>	51.2 <sup>b)</sup>	50.7 <sup>b)</sup>	50.6 <sup>b)</sup>	51.0 <sup>b)</sup>	50.9 <sup>b)</sup>	50.8 <sup>b)</sup>
8	9.1	9.1	9.2	8.9	9.2	9.2	50.2	50.2	49.7	50.0	50.4	49.7
9	9.3	9.1	9.3	9.3	9.3	9.4	50.5	50.4	50.7	50.5	50.3	50.4
10	9.2	9.1	9.3	9.1	9.1	9.3	49.8	50.1	50.4	50.0	49.9	50.5
11	9.7	9.8	9.8	9.4	9.4	9.4	50.2	49.8	50.0	49.8	49.8	50.0

Lab. No.	Fish meal (domestic)						Fish meal (imported)					
	1	62.6	63.0	62.8	63.2	63.0	62.9	67.8	67.7	67.9	67.8	67.9
2	63.1	63.0	63.3	63.1	63.1	62.9	67.9	68.0	67.9	67.7	67.6	67.7
3	63.4	63.3	63.5	63.5	63.6	63.3	68.0	68.1	68.1	68.3	68.4	68.1
4	64.1	63.6	63.6	63.4	63.6	63.6	68.4	68.3	67.9	68.1	68.1	68.2
5	63.0	63.8	62.9	63.1	63.1	63.4	67.1	68.0	67.0	67.8	67.8	67.6
6	63.0	62.7	63.4	63.1	62.8	63.9	67.5	67.3	67.6	68.2	67.6	68.5
7	63.4	63.2	63.1	63.2	62.9	62.7	68.4	67.4	68.3	69.1	68.8	68.7
8	62.6 <sup>b)</sup>	62.5 <sup>b)</sup>	62.3 <sup>b)</sup>	62.2 <sup>b)</sup>	62.9 <sup>b)</sup>	62.0 <sup>b)</sup>	66.4 <sup>a)</sup>	66.3 <sup>a)</sup>	66.3 <sup>a)</sup>	68.0 <sup>a)</sup>	68.5 <sup>a)</sup>	67.9 <sup>a)</sup>
9	63.4	63.3	63.5	63.9	63.5	63.5	68.4	67.8	68.1	68.3	68.0	68.6
10	63.0	63.2	63.7	63.0	63.0	63.5	67.8	67.6	68.1	67.5	67.6	68.0
11	62.7	62.8	62.4	62.9	62.6	62.9	67.8	67.8	67.8	67.6	67.3	67.2

Lab. No.	Alfalfa hay						L-lysine-HCl					
	1	18.2	18.1	18.2	17.7	18.1	18.0	95.9	95.9	95.9	95.9	95.8
2	17.8	18.0	18.0	18.1	17.9	17.6	96.1	95.0	94.8	96.0	94.9	94.8
3	18.1	18.0	18.1	18.0	18.0	18.1	96.5	96.5	96.7	96.6	96.5	96.4
4	18.2	18.1	18.0	18.1	18.2	18.0	96.3	95.9	95.8	95.8	95.8	95.9
5	18.3	18.8	18.5	18.7	18.9	18.7	95.2	96.0	96.2	96.2	96.0	96.2
6	18.1	18.1	18.4	18.1	18.0	18.2	94.1	93.5	92.8	93.4	93.4	92.9
7	19.4 <sup>b)</sup>	19.7 <sup>b)</sup>	19.6 <sup>b)</sup>	19.2 <sup>b)</sup>	19.7 <sup>b)</sup>	19.7 <sup>b)</sup>	93.0	92.6	93.1	93.6	92.9	92.8
8	17.0	17.8	17.4	17.8	18.1	17.5	93.3	93.7	93.7	93.3	93.5	93.7
9	19.1 <sup>a)</sup>	18.0 <sup>a)</sup>	18.0 <sup>a)</sup>	18.1 <sup>a)</sup>	18.2 <sup>a)</sup>	18.1 <sup>a)</sup>	95.5	95.7	95.0	95.6	95.7	96.2
10	18.2	18.1	18.2	18.1	18.1	18.3	95.4	95.4	96.1	95.4	95.2	96.2
11	18.2	18.3	18.3	18.2	18.3	18.3	95.8	94.9	94.9	95.4	94.6	94.7

a) Outlier by Cochran test

b) Outlier by Grubbs test



**Table 5 Results of collaborative study**

Sample	Number of valid labs	Number of outlying labs	All average estd. protein (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>R</sub> <sup>b)</sup> (%)	HorRat <sup>c)</sup>
Formula feed for cattle	9	2	13.4	0.7	1.1	0.3
Formula feed for swine	9	2	19.1	0.7	1.2	0.4
Formula feed for poultry	9	2	19.4	0.7	0.9	0.3
Wheat bran	9	2	16.1	0.8	1.2	0.3
Grain sorghum	9	2	9.3	0.9	1.5	0.4
Soybean meal	9	2	50.1	0.4	0.5	0.2
Fish meal (domestic)	10	1	63.2	0.4	0.5	0.2
Fish meal (imported)	10	1	67.9	0.4	0.5	0.2
Alfalfa hay	9	2	18.1	1.0	1.6	0.5
L-lysine-HCl	11	0	95.1	0.4	1.2	0.5

a) Repeatability (relative standard deviation)

b) Reproducibility (relative standard deviation)

c) HorRat is calculated from modified Horwitz formula

Table 5 のとおり、各試料の繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) として 0.4~1.0%及び 0.5~1.6%, 全窒素含量に基づく HorRat は 0.2~0.5 の範囲にあり、分析法の妥当性が確認された。なお、塩酸 L-リジンの理論定量値は 95.88%で、外れ値を報告する試験室はなかったが 11 試験室の中で 3 試験室はやや低い定量値を示した。

Bicsak<sup>8)</sup>の報告では大豆油かすの繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) として 0.77%及び 1.24%, マイロの繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) として 2.57%及び 2.84%, 塩酸 L-リジンの繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) として 0.38%及び 0.75%であり、著者らの検討結果とほぼ同様の成績であった。

共同試験で使用された燃焼法による粗たん白質定量のための自動分析装置を Table 6 に示した。

**Table 6 Instruments used the collaborative study**

Model	
Vario MAX	(Elementar)
Rapid NIII Nitrogen-Analyzer	(Elementar)
Flash EA 1112N/P	(THERMO ELECTRON)
JM3000N	(J-SCIENCE LAB)
NC-220F	(Sumika Chemical Analysis Service)
NC-1000	(Sumika Chemical Analysis Service)
Tru Spec N	(LECO)
FP-2000	(LECO)

#### 4 まとめ

飼料中の粗たん白質について燃焼法を用いた定量法を検討したところ次の結果を得た。

- 1) 燃焼法による粗たん白質の定量値の繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 0.07~0.79%であり、ケルダール法による粗たん白質の定量値の繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 0.18~1.24%であった。
- 2) 燃焼法による粗たん白質の定量値はケルダール法による定量値に対して平均 0.51%高く、燃焼法とケルダール法による繰返し精度は、相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) を比較した結果、ほぼ同等であった。
- 3) 各試料について Welch の  $t$  検定を有意水準 5%で行ったところ、牛用配合飼料と鶏用配合飼料以外では両方法間では有意差が認められた。
- 4) 試料の種類にもよるが、燃焼法を用いて粗たん白質の定量値を求めた場合には概して、ケルダール法による定量値よりも大きくなる傾向があるため、別途、硝酸態窒素等の非たん白窒素を差し引く等の対応が必要であることが考えられた。

なお、本報告の一部は日本分析化学会第54年会 (2005) において発表された。また、本法は現行の飼料分析基準<sup>11)</sup>に記載されている。

#### 謝 辞

本試験に際し、助言をいただいた現、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所堀田博食品分析研究領域分析ユニット長に感謝の意を表します。また、共同試験にご協力いただいた株式会社アクタック、株式会社アムコ、株式会社ジェイ・サイエンス・ラボ、株式会社住化分析センター、LECOジャパン株式会社、日本シイベルヘグナー株式会社、財団法人日本食品分析センター及び明治飼糧株式会社鹿島工場の試験室の各位に感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) Official Methods of Analysis of AOAC 11ed (1970).
- 2) Official Methods of Analysis of AOAC Int.16ed (1995).
- 3) Official Methods of Analysis of AOAC Int.18ed (2005).
- 4) ISO/FDIS 16634 (2005).
- 5) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成7年11月15日，7畜B第1660号 (1995).
- 6) Sweeney, R. A.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72, 770 (1989).
- 7) Sweeney, R. A. & Rexroad, P.R.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70, 1028 (1987).
- 8) Bicsak, R. C.: J. AOAC Int., 76, 780 (1993).
- 9) Horwitz, W.: IUPAC Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies: Revised 1994, Pure and Appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 10) M. Thompson.: Analyst, 125, 385 (2000).
- 11) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成20年4月1日，19消安第14729号 (2008).

**技術レポート****2 共通試料による飼料中の鉛の共同試験について**

森 有希子\*

**1 目 的**

農林水産省の定めた有害化学物質のサーベイランス・モニタリングに関するガイドライン<sup>1)</sup>の中で、当該サーベイランス・モニタリングの結果を評価・公表するに当たっては、個々の分析法について、妥当性確認結果、定量限界、検出限界、標準添加回収率等の技術的情報を明らかにすることが求められている。

飼料分析基準<sup>2)</sup>に記載されている鉛の分析法については、共同試験による妥当性確認が行われていなかった。そのため、今般、改めて実施したのでその結果を報告する。

**2 分析試料**

市販の鶏用配合飼料及び飼料原料（魚粉）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

**3 分析実施要領****3.1 分析方法**

分析法は飼料分析基準第 4 章第 1 節 17 によった。ただし、標準液及び試料溶液の酸濃度を合わせるため、標準液の希釈には、水ではなく 1 mol/L 塩酸を用いた。

**3.2 分析点数**

各試験室において、濃度を示さずに配布した鉛標準液を試料に添加し、それぞれ 2 点併行分析を実施した。更に、魚粉については自然汚染が認められた（約 0.6 mg/kg）ため、鉛標準液を添加しない試料についても同様に 2 点併行分析を実施した。なお、鶏用配合飼料については自然汚染が認められなかった（検出下限（0.2 mg/kg）未満）。

**3.3 分析実施期間**

平成 19 年 4 月 9 日～平成 19 年 5 月 18 日

**3.4 分析実施試験室**

独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター大阪事務所及び同福岡センター（計 6 試験室）

**4 分析成績**

鶏用配合飼料に鉛として 3.0 mg/kg 相当量を添加した試料並びに魚粉及び当該魚粉に鉛として 3.0 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、6 試験室において共同試験を実施した。

その結果は表 1 のとおりで、鶏用配合飼料の添加試料の測定値（全試験室の平均値、以下同じ。）は 3.02 mg/kg（添加回収率として 101%）、その繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（RSD<sub>r</sub>

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター、現 同札幌センター小樽事務所

及び RSD<sub>R</sub>) としてそれぞれ 2.7%及び 3.4%, HorRat は 0.25 であった. また, 魚粉の無添加試料の測定値は 0.607 mg/kg, その RSD<sub>F</sub>及び RSD<sub>R</sub>はそれぞれ 18%及び 29%, HorRat は 1.7 であり, 魚粉の添加試料の測定値は 3.47 mg/kg (添加回収率として 95.4%), その RSD<sub>F</sub>及び RSD<sub>R</sub>はそれぞれ 3.1%及び 5.5%, HorRat は 0.41 であった.

鉛を添加した試料においては, いずれも HorRat が 0.5 を下回っていたが, この原因として, 当センターの各試験室が本分析法に熟練していることが考えられた.

参考のため, 各試験室で使用した原子吸光光度計の機種及びそのバックグラウンド補正方法を表 2 に示した.

表 1 共同試験結果

試験室番号	鶏用配合飼料		(単位 : mg/kg)			
			魚粉 (無添加)		魚粉 (添加)	
1	3.01	3.14	0.641	0.496	3.39	3.44
2	3.09	2.97	0.612	0.559	3.56	3.68
3	3.11	2.94	0.474	0.501	3.56	3.47
4	2.99	3.04	0.525	0.476	3.22	3.14
5	3.06	3.18	0.540	0.632	3.50	3.83
6	2.87	2.87	1.07	0.753	3.42	3.42
測定値 <sup>a)</sup>	3.02		0.607		3.47	
添加回収率 <sup>a)</sup> (%)	101		---		95.4	
RSD <sub>F</sub> <sup>b)</sup> (%)	2.7		18		3.1	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	3.4		29		5.5	
HorRat	0.25		1.7		0.41	

a) 平均値 (n=12)

b) 室内繰返し精度 (相対標準偏差)

c) 室間再現精度 (相対標準偏差)

表 2 共同試験に使用した原子吸光光度計及び補正方法

試験室番号	原子吸光光度計の機種名		補正方法
1	Thermo Elemental製	SOLAAR M5	D <sub>2</sub> ランプ補正
2	日立製作所製	Z-5010	偏光ゼーマン補正
3	島津製作所製	AA-6800	D <sub>2</sub> ランプ補正
4	日立製作所製	Z-5310	偏光ゼーマン補正
5	Thermo Elemental製	SOLAAR AA	D <sub>2</sub> ランプ補正
6	Thermo Elemental製	SOLAAR 969 AA	D <sub>2</sub> ランプ補正

## 文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：“「サーベイランス・モニタリングの計画・実施及び結果の評価・公表に関するガイドライン」の制定について”，平成 17 年 6 月 7 日，17 消安第 2330 号 (2005).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).

**技術レポート**

### 3 飼料中のマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法に係る添加回収率等の確認及び共通試料による共同試験の結果について

小森谷 敏一\*

#### 1 緒 言

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

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

農林水産省が実施した「平成18年度有害化学物質リスク管理基礎調査事業」において、MG及びLMGによる魚粉の汚染が判明したところであり、このような汚染魚粉が飼料として使用され、食品にMG及びLMGが残留することのないよう、早急にモニタリングを実施する必要がある。

飼料中のMG及びLMGの分析法については、魚粉を主体とした養殖魚用飼料を対象とした分析法として「養殖魚用飼料を対象としたマラカイトグリーン等の分析法のお知らせについて」（平成18年11月21日付け18消安第9224号農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知）が暫定的に定められていたが、この方法について、適用範囲を魚粉及び畜産用配合飼料に拡大した上で飼料分析基準に収載するため、その添加回収率等に係る検討及び共通試料による共同試験を実施したので、その結果を報告する。

#### 2 実験方法

##### 2.1 試 料

市販の飼料原料（魚粉）及び配合飼料（まだい育成用、中すう育成用及び子豚育成用配合飼料）をそれぞれ1mmの網ふるいを通過するまで粉砕し、供試試料とした。

##### 2.2 定量方法

分析法は飼料分析基準<sup>2)</sup>第8章第2節1によった。

##### 2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（LC-MS/MS）：

LC部：Agilent Technologies製 1200 Series

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

2) 高速ホモジナイザー：Hsiangtai製 HG-200（使用時回転数15,000 rpm）

3) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカーSR-2W

\* 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

- 4) 遠心分離器：久保田製作所製 8410
- 5) ロータリーエバポレーター：BÜCHI 製 R-200
- 6) ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) :  
Varian 製 Bond Elut SCX (リザーバー容量 3 mL)
- 7) メンブランフィルター：関東化学製 HLC-DISK 13 溶媒系 (PTFE 製)

## 2.3 試 薬

- 1) 標準液調製用 MG (シュウ酸塩) : Sigma-Aldrich 製, 純度 97.2%
- 2) 標準液調製用 LMG : 林純薬工業製, 純度 99.9%
- 3) 内標準液調製用安定同位体元素標識 MG (MG-d<sub>5</sub>) (シュウ酸塩) : 林純薬工業製, 純度 94.6%
- 4) 内標準液調製用安定同位体元素標識 LMG (LMG-d<sub>6</sub>) : 林純薬工業製, 純度 99.9%
- 5) 溶離液調製用アセトニトリル : 関東化学製, LC-MS 用

## 3 結果及び考察

### 3.1 検量線及び定量上限

MG 及び LMG として 1 mL 中に 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 及び 200 ng を含有し, かつ, 安定同位体元素標識 MG (MG-d<sub>5</sub>) 及び安定同位体元素標識 LMG (LMG-d<sub>6</sub>) としてそれぞれ 5 ng を含有する各混合標準液を調製し, これらの液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し, 得られた MRM クロマトグラムから MG 及び LMG と MG-d<sub>5</sub> 及び LMG-d<sub>6</sub> のピーク面積比を求めて検量線を作成した. その結果, 検量線は, MG 及び LMG として 1.25~1,000 pg の範囲で直線性を示した.

本法の検量線の直線範囲から, 最終試料溶液における定量上限は, MG 及び LMG として 200 ng/mL である. 従って, 200 µg/kg を超えて MG 又は LMG を含有する試料については, 内標準添加量及び最終液量をそれぞれ増やして分析を行う必要があると考えられた.

### 3.2 妨害物質の検討

魚粉及び配合飼料 (養魚用, 鶏用及び豚用) について本法に従って MRM クロマトグラムを作成し, MG 及び LMG の定量を妨害するピークの有無を検討した. その結果, MG 及び LMG の定量を妨害するピークは認められなかった.

### 3.3 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した.

MG 及び LMG として, 魚粉及び配合飼料にそれぞれ 5 及び 100 µg/kg 相当量ずつを添加した試料について, 本法に従って 3 回分析を行い, その回収率及び繰返し精度を求めた.

その結果, 表 1 のとおり, MG の平均回収率は 73.7~90.5%, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 2.4% 以下であった. また, LMG の平均回収率は 77.1~99.0%, その繰返し精度は RSD として 3.7% 以下であった.

なお, 参考として, 内標準として添加した安定同位体標識 MG について, ピーク面積から求めた見かけ上の回収率の総平均値及び RSD は, それぞれ 53.5% 及び 4.5% であった. 同様に, 安定同位体標識 LMG については, それぞれ 62.4% 及び 3.3% であった.

表 1 添加回収試験結果

(%)				
添加成分	試料の種類	添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均回収率 <sup>a)</sup>	繰返し精度 <sup>b)</sup>
MG	魚粉	5	78.1	2.4
		100	81.4	1.2
	まだい育成用配合飼料	100	73.7	1.6
		中すう育成用配合飼料	5	87.9
	100		84.2	0.7
	子豚育成用配合飼料	5	85.6	1.4
100		90.5	1.6	
LMG	魚粉	5	85.0	3.7
		100	77.1	2.6
	まだい育成用配合飼料	100	93.9	1.9
		中すう育成用配合飼料	5	94.5
	100		95.2	1.6
	子豚育成用配合飼料	5	98.3	1.1
100		99.0	3.1	

a)  $n=3$ 

b) 相対標準偏差

### 3.4 共同試験

本法の再現精度を調査するため、魚粉及び子豚育成用配合飼料に MG 及び LMG としてそれぞれ  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した共通試料を用い、本法に従って共同試験を実施した。参加試験室は、アジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンター、全国酪農業協同組合連合会分析センター、財団法人食品環境検査協会東京事業所、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同規格検査部及び同神戸センターの 9 試験室であった。

MG の共同試験の結果は表 2 のとおりであり、魚粉における平均回収率は 86.1%，その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 ( $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 3.9% 及び 7.4%，HorRat は 0.34 であった。また、子豚育成用配合飼料における平均回収率は 93.8%，それらの室内繰返し精度及び室間再現精度は  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 4.0% 及び 5.4% であり、HorRat は 0.25 であった。

また、LMG の共同試験の結果は表 3 のとおりであり、魚粉における平均回収率は 91.3%，その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 ( $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$ ) として 4.6% 及び 16%，HorRat は 0.74 であった。また、子豚育成用配合飼料における平均回収率は 100%，それらの室内繰返し精度及び室間再現精度は  $\text{RSD}_f$  及び  $\text{RSD}_R$  として 3.9% 及び 6.1% であり、HorRat は 0.28 であった。

なお、参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を表 4 に示した。

表 2 MG の共同試験結果

試験室	(μg/kg)			
	魚粉 <sup>a)</sup>		子豚育成用配合飼料 <sup>a)</sup>	
1	1.60	1.76	1.79	1.97
2	1.50	1.66	1.79	1.78
3	1.90	1.98	2.01	2.04
4	1.68	1.66	1.81	1.88
5	1.63	1.64	1.96	1.89
6	1.66	1.60	1.78	1.79
7	1.71	1.70	1.73	1.89
8	1.79	1.93	1.76	1.93
9	1.80	1.79	2.02	1.95
総平均値	1.72		1.88	
回収率(%)	86.1		93.8	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	3.9		4.0	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	7.4		5.4	
HorRat	0.34		0.25	

a) 添加濃度 : 2 μg/kg

b) 室内繰返し精度 (相対標準偏差)

c) 室間再現精度 (相対標準偏差)

表 3 LMG の共同試験結果

試験室	(μg/kg)			
	魚粉 <sup>a)</sup>		子豚育成用配合飼料 <sup>a)</sup>	
1	1.70	1.46	1.73	1.98
2	1.76	1.86	2.18	2.04
3	2.46	2.51	2.19	2.23
4	1.89	1.91	1.96	2.07
5	1.70	1.78	1.99	2.00
6	1.55	1.53	2.00	1.98
7	1.67	1.50	1.81	1.93
8	2.03	2.01	2.01	1.99
9	1.71	1.85	2.01	2.05
総平均値	1.83		2.01	
回収率(%)	91.3		100	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	4.6		3.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	16		6.1	
HorRat	0.74		0.28	

a) 添加濃度 : 2 μg/kg

b) 室内繰返し精度 (相対標準偏差)

c) 室間再現精度 (相対標準偏差)



表 4 共同試験に使用された LC-MS/MS 機器等

試験室	液体クロマトグラフ	タンデム型質量分析計	LCカラム (内径×長さ, 粒径)
1	Agilent Technologies 1100 Series	Applied Biosystems API 4000	和光純薬工業 Wakosil-II 5C18 RS (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
2	Waters Alliance 2695	Waters micromass Quattro Micro	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	島津製作所 LC20 AD	Applied Biosystems API 4000	和光純薬工業 Wakosil-II 5C18 RS (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
4	Waters Alliance 2695	Waters micromass Quattro Micro	ジーエルサイエンス Inertsil ODS-3 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm)
6	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
7	Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm×150 mm, 5 μm)
8	Waters Alliance 2795	Waters micromass Quattro Premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
9	Waters ACQUITY UPLC	Waters micromass Quattro Premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)

#### 4 まとめ

飼料中の MG 及び LMG の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法について、添加回収率、繰返し精度等に係る検討及び共同試験による室間再現精度の確認を行ったところ次の結果が得られ、本法は、魚粉及び畜産用配合飼料に適用可能と考えられた。

- 1) MG 及び LMG として、魚粉及び配合飼料に 5 及び 100 μg/kg 相当量を添加し、本法に従って添加回収試験を実施した結果、その平均回収率はそれぞれ 73.7~90.5%及び 77.1~99.0%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 2.4%以下及び 3.7%以下であった。
- 2) 魚粉及び子豚育成用配合飼料に MG 及び LMG としてそれぞれ 2 μg/kg 相当量を添加した試料を用いて、6 試験室において本法による共同試験を実施した。その結果、MG については魚粉における平均回収率は 86.1%であり、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) として 3.9%及び 7.4%であり、HorRat は 0.34 であった。また、子豚育成用配合飼料における平均回収率は 93.8%であり、それらの室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 4.0%及び 5.4%であり、HorRat は 0.25 であった。

次に LMG については魚粉における平均回収率は 91.3%であり、その室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 4.6%及び 16%であり、HorRat は 0.74 であった。また、子豚育成用配合飼料における平均回収率は 100%、それらの室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 3.9%及び 6.1%であり、HorRat は 0.28 であった。

- 3) 本法は、平成 20 年 4 月 1 日付けで新たに制定された飼料分析基準に記載された。なお、前述の「養殖魚用飼料を対象としたマラカイトグリーン等の分析法のお知らせについて」（平成 18 年 11 月 21 日付け 18 消安第 9224 号農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知）は、同日付けで廃止された。

#### 謝 辞

共同試験に御協力頂いたアジレント・テクノロジー株式会社，全国酪農業協同組合連合会，財団法人食品環境検査協会，社団法人日本科学飼料協会，財団法人日本食品分析センター及び財団法人日本冷凍食品検査協会の試験室の各位に感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) 食品安全委員会：“食品健康影響評価の結果の通知について”，平成 17 年 11 月 24 日，府食第 1140 号 (2005).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).

**技術レポート****4 とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル中の水分の測定**

山多 利秋\*

**1 緒 言**

とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル（以下「DDGS」（Distiller's Dried Grains with Solubles）という。）は、とうもろこしからドライミル方式により燃料用アルコールを生産する過程で生じる副産物である<sup>1)</sup>。DDGSは、米国におけるバイオエタノール生産の増大に伴い、乳牛・肉牛用飼料だけでなく豚・鶏用飼料にも使用されるようになっており、今後我が国においても飼料利用の拡大が見込まれている<sup>1)</sup>。

飼料中の水分の分析法は、飼料分析基準<sup>2)</sup>において135°C、2時間の乾燥減量法（以下「135°C法」という。）及び105°C、3時間の乾燥減量法（以下「105°C法」という。）が規定されている。平成20年4月1日付けで新たに制定される前の飼料分析基準<sup>3)</sup>においては、105°C法の適用範囲はフィッシュソリュブル吸着飼料、糖蜜吸着飼料及びグルテンフィードと規定されており、DDGSには135°C法が適用されることとなっていた。

一方、米国飼料工業協会（AFIA）では、135°C法では水分が過大評価されるとして105°C法を推奨している<sup>4)</sup>。また、国内の配合飼料製造業者からは、135°C法ではばらつきも大きくなるとして、品質管理の円滑な推進のためDDGSに105°C法を適用することを要望されていたところである。以上のことから、DDGS中の水分の測定法に105°C法を適用するため、その分析精度を確認したので報告する。

**2 分析方法****2.1 分析試料**

5種類のDDGS（米国产）について、1mmの網ふるいを通過するまで粉砕したものをを用いた。

**2.2 器 具**

恒温乾燥器：いすゞ製作所製 NS-111S

**2.3 分析方法**

分析試料2~5gを正確に量ってアルミニウム製ひょう量皿（あらかじめ乾燥して重さを正確に量っておいたもの）に入れ、135±2°Cで2時間（135°C法）又は105±2°Cで3時間（105°C法）乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量り、試料中の水分量を算出した。

**3 結果と考察**

5種類の分析試料について、105°C法及び135°C法によりそれぞれ7点併行分析を実施した。その結果はTable 1のとおりであり、いずれの試料においても、105°C法による水分の測定値は135°C法による測定値より約2%低かった。また、それぞれの繰返し精度は、相対標準偏差（RSD）として105°C法で2.0~3.8%、135°C法で4.4~7.5%であり、105°C法の方が測定値のばらつきが少ないと考えられた。

また、乾燥温度を105°C及び135°Cに設定し、それぞれ乾燥時間を変えて乾燥減量の推移を確認し

\* 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

た. その結果は Fig. 1 に示すとおりであり, 105°C での乾燥減量は 3 時間でおおよそ恒量に達していると考えられたが, 135°C での乾燥減量は 2 時間では恒量に達していないことが明らかであった.

以上のことから, DDGS 中の水分の測定においては, 105°C 法がより適していると考えられた.

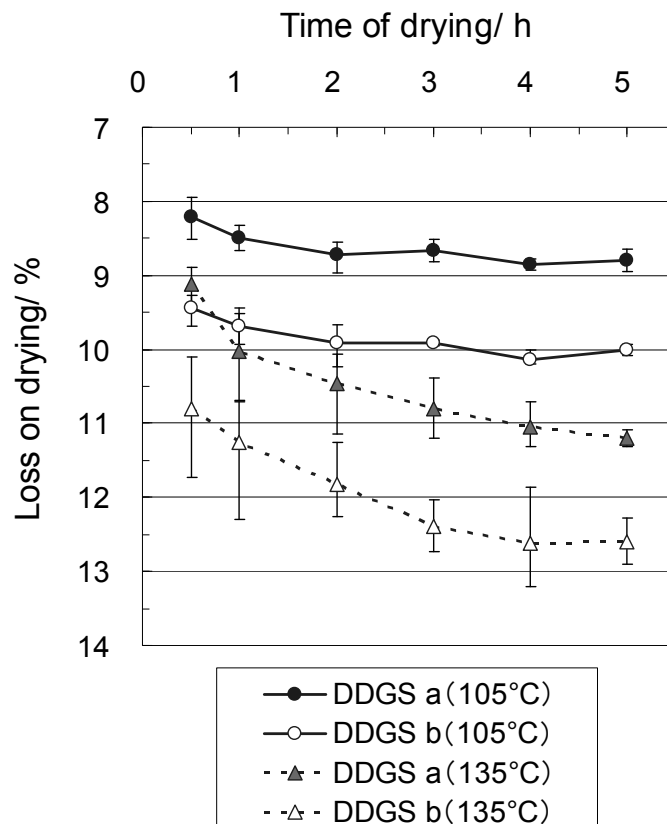
105°C 法及び 135°C 法の間で測定値に差が生じた原因については, DDGS に高級アルコール, カルボン酸等の比較的沸点の高い物質が含まれる可能性が考えられた.

**Table 1** Moisture in DDGS determined by two loss-on-drying methods (%)

Sample No.	Method of drying			
	105°C, 3 h		135°C, 2 h	
	Moisture <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Moisture <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
1	9.79	( 2.0)	11.90	( 5.4)
2	11.73	( 3.1)	13.94	( 4.4)
3	11.88	( 3.2)	14.04	( 7.1)
4	12.07	( 3.2)	14.11	( 6.5)
5	11.28	( 3.8)	13.40	( 7.5)

a) Mean value ( $n=7$ )

b) Relative standard deviation of repeatability



**Fig. 1** Variation of loss-on-drying with time and temperature

参考までに、上記のうち 2 種類の分析試料について、試験日を変えて 105°C 法及び 135°C 法による 7 点併行分析を繰り返し、得られた測定値について分散分析を行った。その結果は Table 2 のとおりであり、日間分散と日内分散との比には、試験法の違いによる差異は認められなかった。

**Table 2 Intermediate precision on trial days**

Sample No.	1		4	
	Method of drying		Method of drying	
	105°C, 3 h	135°C, 2 h	105°C, 3 h	135°C, 2 h
Moisture (%) <sup>a)</sup>	9.66	11.59	11.54	13.82
Between-day variation <sup>b)</sup> (%)	0.149	0.91	0.070	0.44
Within-day variation <sup>c)</sup> (%)	0.045	0.28	0.118	0.61
Variance ratio <sup>d)</sup>	3.3	3.3	0.59	0.72

a) Mean value ( $n=21$ )

b) Standard deviation of between-day variation

c) Standard deviation of within-day variation

d) Between-day variation/within-day variation ( $F(2, 18; 0.025)=4.56$ )

#### 4 まとめ

とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル中の水分の測定法に 105°C、3 時間の乾燥減量法を適用することについて、精度確認のための試験を実施した結果、以下の結果が得られた。

- 1) 5 種類の分析試料について 105°C 法及び 135°C 法により水分を測定した結果、すべての試料において、105°C 法による測定値の方が約 2% 低く、またばらつきも少なかった。
- 2) 乾燥時間を変えて乾燥減量を測定した結果、135°C で乾燥した場合、2 時間では恒量に達しないことがわかった。
- 3) 試験日を変えて分析した場合の室内再現精度については、105°C 法と 135°C 法とで差異は認められなかった。

なお、平成 20 年 4 月 1 日付けで新たに制定された飼料分析基準 <sup>2)</sup>において、とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル中の水分の測定については、105°C 法が適用されることとなった。

#### 文 献

- 1) 唐澤哲也，郷達也：「米国における燃料用エタノールの生産拡大が飼料穀物の需給へ与える影響」，畜産の情報【海外編】平成 18 年 10 月号（第 204 号），50 (2006).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 4) American Feed Industry Association: “Evaluation of Analytical Methods for Analysis of Dried Distillers Grains with Solubles”, AFIA Sub-Working Group Final Report and Recommendations, February 2007.

**技術レポート****5 飼料中のクロラムフェニコールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法（中間報告）**

山本 克己\*

**1 緒 言**

クロラムフェニコールは、*Streptomyces venezuelae* 由来の広範囲スペクトルの抗生物質であり、現在では化学合成法によって工業的な製造が行われている<sup>1)</sup>。しかしながら、その副作用として、骨髄の造血機能に毒性を及ぼし、再生不良性貧血等を誘発する可能性がある<sup>2)</sup>ため、我が国では食品衛生法に基づく残留基準において不検出とされる農薬等の成分となっている。また、飼料添加物に指定された抗菌性物質ではないため、飼料安全法に基づく成分規格等省令<sup>3)</sup>により、飼料に含まれてはならないとされている。

平成 18 年度の輸入食品検査において、ベトナム産のイカ（及びその加工品）、エビ（及びその加工品）及びイトヨリから、クロラムフェニコールが検出された。

現在、クロラムフェニコールの定量法は、厚生労働省の告示分析法（液体クロマトグラフ質量分析計による方法）等があり、飼料においては、菅野<sup>4)</sup>による脱脂粉乳を対象とした方法（液体クロマトグラフによる方法）が飼料分析基準<sup>5)</sup>に記載されている。そこで筆者は、後者の飼料分析基準を参考に、魚粉及び魚粉を含む配合飼料への適用の拡大及び液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（LC-MS/MS）を用いることにより、より低濃度での定量の可否について検討したのでその概要を報告する。

**2 実験方法****2.1 試 料**

検討に用いた国産魚粉、輸入魚粉及び配合飼料（ほ乳期子豚用配合飼料及びぎんざけ育成用）は、それぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

**2.2 試 薬**

## 1) クロラムフェニコール標準液

クロラムフェニコール（ $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ）標準品（和光純薬工業製、純度 98.0%）20 mg を正確に量って 200 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてクロラムフェニコール標準原液を調製した（この液 1 mL はクロラムフェニコールとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をアセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し、1 mL 中に 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 及び 0.1  $\mu\text{g}$  を含有するクロラムフェニコール標準液を調製した。

## 2) シリカゲル

カラムクロマトグラフ用シリカゲル（Silica gel 60, Merck 製、粒径 63~200  $\mu\text{m}$ ）を、110°C で 2 時間乾燥した。

\* 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

- 3) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に用いるアセトニトリル及び水は、高速液体クロマトグラフ用を使用した。その他の試薬は特級試薬を用いた。

### 2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ：Waters 製 Alliance 2695
- 2) タンデム型質量分析計：Waters 製 Quattro micro API Mass Analyzer
- 3) マグネチックスターラー：柴田科学製 MU-4
- 4) ロータリーエバポレーター：シバタインテック製 RE121
- 5) 高速遠心分離器：日立製作所製 SCT15B

### 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、酢酸エチル 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、ろ紙（5 種 A）でろ過した。ろ液 50 mL を 100 mL のなす型フラスコに入れ、50°C 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。クロロホルム 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラムクロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

#### 2) カラムクロマトグラフィー

シリカゲル 5 g をクロロホルムに懸濁させてカラム管（内径 15 mm）に流し込み、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させ、カラムを調製した。試料溶液をカラムに入れ、容器をクロロホルム 5 mL で 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加えた後、1 分間に 1~2 mL の速さで流出させた。次に、クロロホルム-メタノール（97+3）30 mL を加えて同様に流出させ、カラムを洗浄した後、50 mL のなす型フラスコをカラム管の下におき、クロロホルム-メタノール（7+3）30 mL を加え、クロラムフェニコールを溶出させた。溶出液を 50°C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル-水（1+1）1.0 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10,000 rpm（5,000×g）で 5 分間遠心分離し、上澄み液を LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

#### 3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各クロラムフェニコール標準液各 10 µL を LC-MS/MS に注入し、マルチプルリアクションモニタリング（MRM）クロマトグラムを作成し、ピーク面積又は高さより検量線を作成し、試料中のクロラムフェニコール量を算出した。

なお、LC-MS/MS の分析条件を表 1 に示した。

表 1 LC-MS/MS 測定条件

カラム	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (内径2.1 mm, 長さ150 mm, 粒径5 $\mu$ m)
カラム槽温度	40°C
溶離液	A:10 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液 B:アセトニトリル
グラジエント	0分 (30%B) →15分 (30%B) →15.1分 (100%B) →25分 (100%B) → 25.1分 (30%B) →40分 (30%B)
流速	0.35 mL/min
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
モード	ネガティブ
ネブライザーガス	N <sub>2</sub> (600 L/h)
コーンガス	N <sub>2</sub> (10 L/h)
キャピラリー電圧	3.0 kV
モニターイオン	$m/z$ 321.2 (プレカーサーイオン), 152.1 (プロダクトイオン)

### 3 結果及び考察

#### 3.1 タンデム型質量分析計条件の検討

クロラムフェニコール標準液について、今回の測定条件においてスキャンモードで測定し、図1のマススペクトルを得た。この結果から、最もイオン強度の大きい  $m/z$  321.2 ([M-H]<sup>-</sup>) をプレカーサーイオンとして採用した。

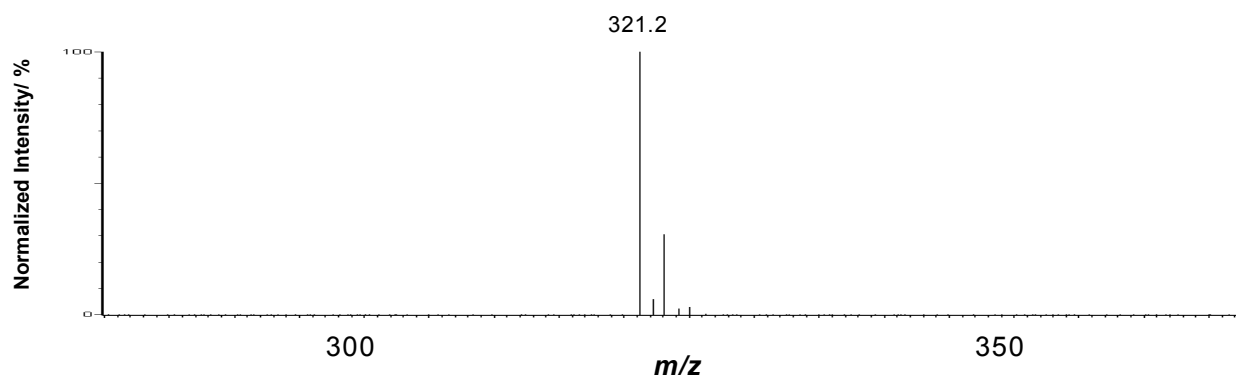


図 1 クロラムフェニコールの MS スペクトル

次に、クロラムフェニコールのプロダクトイオンの MS スペクトルを測定したところ、図2のとおり、主なプロダクトイオンとして  $m/z$  152.1, 176.2, 194.2 及び 257.2 などが得られた。この結果から、最もイオン強度の大きい  $m/z$  152.1 をプロダクトイオンとして採用した。



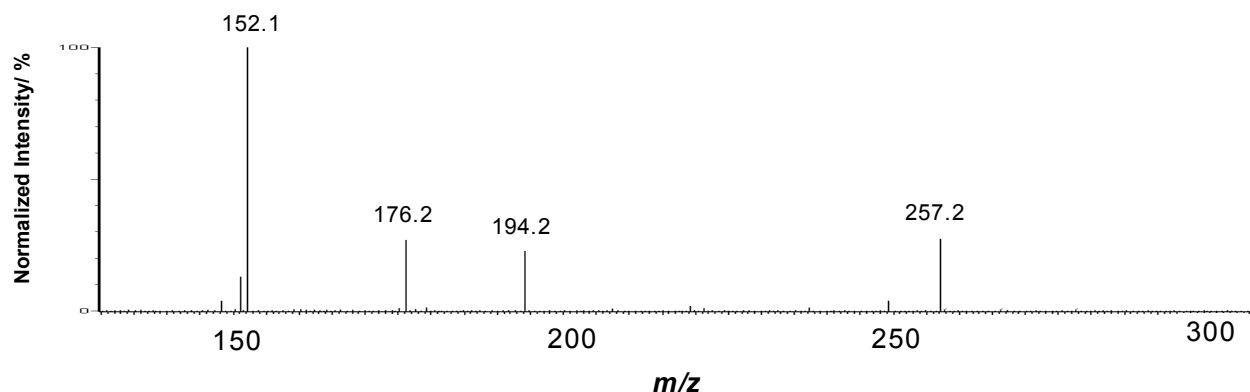


図2 クロラムフェニコールのプロダクトイオンのMSスペクトル

### 3.2 液体クロマトグラフの測定条件の検討

溶離液として、10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (7+3)，水-アセトニトリル (7+3)，10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-メタノール (13+7) 及び水-メタノール (13+7) を検討した。その結果、10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (7+3)，水-アセトニトリル (7+3) において感度が良好であった。両者は、感度及びピーク形状において大きな差は認められなかったが、イオン化効率を考慮し、今回は溶離液を10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (7+3) とすることにした。

### 3.3 検量線の作成

2.2 の1)に従って調製した標準液をそれぞれ10 µL ずつ LC-MS/MS に注入し、得られたMRMクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成した。その結果、検量線は0.05~1 ng の範囲で直線性を示した。

### 3.4 妨害物質の検討

国産魚粉 (2 種類)，輸入魚粉 (2 種類) 及び配合飼料 (ブロイラー肥育後期用，ほ乳期子豚育成用及びぎんざけ育成用) を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

### 3.5 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した。

魚粉及び配合飼料 (ほ乳期子豚育成用及び養魚用) に、クロラムフェニコールとしてそれぞれ2 及び5 µg/kg 相当量添加し、本法に従って3 回分析を行い、その回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果、表2 のとおり、クロラムフェニコールの平均回収率は93.3~113 %，その繰返し精度はRSD として9.1%以下であった。

なお、標準液及び添加回収試験で得られた魚粉におけるMRMクロマトグラムの一例を図3 に示した。

表 2 添加回収試験結果

試料の種類 添加量	(%)							
	国産魚粉		輸入魚粉		ほ乳期子豚育成 用配合飼料		ぎんざけ育成用 配合飼料	
	分析値 <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	分析値 <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	分析値 <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	分析値 <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
2 µg/kg	93.3	(8.1)	99.3	(9.1)	102	(1.5)	113	(1.0)
5 µg/kg	108	(3.6)	105	(8.5)	94.8	(6.2)	108	(5.5)

a)  $n=3$  の平均回収率

b) 相対標準偏差

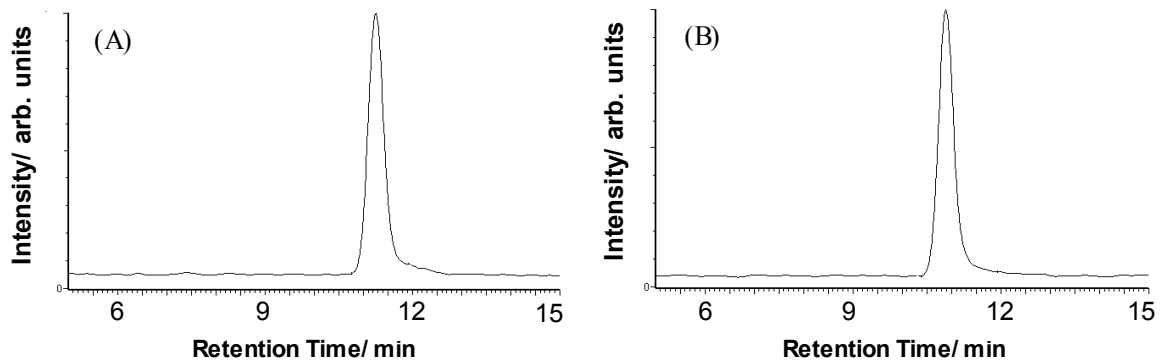


図 3 添加回収試験で得られた MRM クロマトグラムの一例

(A) 標準液 (クロラムフェニコールとして 250 pg 相当量)

(B) 試料溶液 (魚粉, 試料中 5 µg/kg 相当量添加)

### 3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、先の 2 µg/kg 相当量の添加回収試験において得られた MRM クロマトグラムにおけるピークの SN 比を求めた。

その結果、得られたピークの SN 比は、魚粉及び配合飼料においていずれも 10 程度であった。このことから、本法における定量下限は、飼料中で 2 µg/kg と考えられた。また、検出下限は、SN 比が 3 となる濃度から、飼料中で 0.6 µg/kg と見積もられた。

## 4 今後の検討項目

上記のとおり、本法の定量下限は、飼料中で 2 µg/kg であり、検討にあたり目標とした検出感度 (厚生労働省が示している食品の分析法と同等レベル (0.5 µg/kg)) が得られなかった。

このことから、より低濃度の定量が可能となるような LC-MS/MS 分析条件の再検討及び塩素系溶媒を必要としないミニカラム等の導入を視野に入れる必要があると考えられた。

今後は、財団法人日本食品分析センターが検討した分析法<sup>6)</sup>を参考に検討を進める予定である。

## 文 献

- 1) 田中信夫, 中村昭四郎: 抗生物質大要 [第 4 版], 160 (1995).
- 2) Kurylowicz (岡見吉郎訳): 抗生物質論, 154 (1978).

- 3) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 4) 菅野 清：飼料研究報告，29，60 (2004).
- 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) (財) 日本食品分析センター：平成 19 年度飼料に含まれるマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの畜産物への残留に関する調査委託事業（飼料中のマラカイトグリーン等の分析法の開発），21 (2008).

**技術レポート****6 DDGS からの DNA 抽出について**会田 紀雄<sup>\*1</sup>, 橋本 仁康<sup>\*2</sup>**1 緒 言**

DDGS (Distiller's Dried Grains with Solubles) は、トウモロコシを原料として燃料用エタノール (バイオエタノール) を生産する際に生じる副産物であり、米国、カナダ、EU 等では、従来から家畜用飼料として使用されてきた。

最近の石油価格の高騰、地球温暖化対策としての化石燃料からの代替え需要等からバイオエタノールの生産量が増加し、原料であるトウモロコシの供給が厳しくなっている。このため、我が国では、DDGS の飼料用への利用はあまり見られなかったが、トウモロコシの代替え原料として今後需要が伸びるものと考えられる。農林水産省生産局、消費・安全局作成「畜産をめぐる情勢について (平成 20 年 1 月)」によれば、米国からの DDGS の輸入量は 2006 年度には 42 千トンであったものが、2007 年度には 88 千トンになると予想している<sup>1)</sup>。また、米国における DDGS の生産量は 2006 年に 8.6 百万トンであったが、2010 年には 36 百万トンになると予想されている<sup>2)</sup>。

DDGS は、非食用のバイオエタノール生産の副産物であるため、その原料となるトウモロコシについては必ずしも食用・飼料用の品種が使用されない可能性がある。特に、遺伝子組換えトウモロコシについては、食品又は飼料と異なり、消費者が忌避するような状況は考えにくく、よりバイオエタノール生産に適した品種 (系統) の作出が可能であるため、利用が拡大するものと考えられる。

一方、遺伝子組換えトウモロコシについては、近年、Bt10, Event32 等の安全性が確認されない系統の放出事故が散発している。また、米国以外での遺伝子組換え技術利用作物の開発も盛んになっており、今後日本の安全性確認システムを経ない品種が使用された DDGS が輸入される可能性がある。

そのため、DDGS から DNA を抽出する方法及びその抽出 DNA を用いて遺伝子組換えに関する品種 (系統) を検出できるか検討した。

試験は、農林水産省通知「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」別添 3 組換え DNA 技術応用飼料の検査方法 2.2. トウモロコシ (Bt10) の検査方法<sup>3)</sup> (以下「通知法」という。) に準じて実施した。

**2 試験方法****2.1 試料調製**

米国産 DDGS を遺伝子組換えトウモロコシと同様に 0.5 mm 網ふるいを全通するように粉碎した。ただし、粉碎する際には液体窒素を用いなかった。

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

<sup>\*2</sup> (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

## 2.2 試薬

### 1) 水

水は、超純水（比抵抗値 17 M $\Omega$ ·cm 以上に精製したもの）を 121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌したもの。

### 2) 抽出キット

DNeasy Plant Maxi Kit（QIAGEN 製）

### 3) DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold（Applied Biosystems 製）

### 4) プライマー対

トウモロコシ内在性遺伝子用 トウモロコシ内在性 DNA Zein オリゴヌクレオチド（Zein n-5' & 3', ニッポンジーン製（318-05671））

Bt11 検知用 GM トウモロコシ系統別 DNA Bt11-3 オリゴヌクレオチド（Bt11 3-5' & 3', ニッポンジーン（319-05461））

*cp4 epsps* 検知用<sup>4)</sup> EPS011-5'（5'-gcc tgc tgt cgg aaa acc ct-3'）及び EPS011-3'（5'-ttc gta tgc gag agt tgc atc ttc-3'）を TE 緩衝液で 50  $\mu$ mol/L に希釈したものを等量混合したもの（合成はタカラバイオに依頼）

### 5) イソプロパノール（特級）

### 6) エタノール（特級）

### 7) TAE 緩衝液（pH 8.0）

50 倍 TAE（ニッポンジーン製）を超純水で 50 倍に希釈したもの。

### 8) アガロース

アガロースゲル S（ニッポンジーン製）3 g を TAE 緩衝液 100 mL に加え、加温して溶かし、50~60°C に冷却させた後、ゲルの厚さが 3~4 mm になるようゲル成形型に流し込み、固化させた。

### 9) DNA サイズマーカー

100 bp DNA Ladder（宝酒造製）を用いた。

### 10) 臭化エチジウム溶液

エチジウムブロマイド溶液（10 mg/mL）（Bio-Rad Laboratories 製）を TAE 緩衝液で 10,000 倍に希釈したもの。

### 11) ローディングバッファー

100 bp DNA Ladder（宝酒造製）に付属のものを用いた。

### 12) Proteinase K

Proteinase K (>600 mAU/mL)（QIAGEN 製）を用いた。

### 13) 緩衝液等

AP1Buffer, RNase A, AP2Buffer, AP3/E Buffer 及び Buffer AW はキットに、10 $\times$ PCR Buffer II, dNTPs（2 mM each）及び MgCl<sub>2</sub> 溶液（25 mM）は DNA ポリメラーゼに付属のものを使用した。

### 14) TE 緩衝液

ニッポンジーン製を用いた。

### 15) PCR 反応液

- i) Zein 及び Bt10 : 1 サンプルあたり, 水 13.24  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ PCR Buffer II 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 2  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  溶液 1.5  $\mu\text{L}$ , プライマー対 0.6  $\mu\text{L}$ , DNA ポリメラーゼ 0.16  $\mu\text{L}$  を混合したもの.
- ii) *cp4 epsps* : 1 サンプルあたり, 水 15.875  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ PCR Buffer II 2.708  $\mu\text{L}$ , dNTPs 2.167  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  溶液 1.625  $\mu\text{L}$ , プライマー対 0.5  $\mu\text{L}$ , DNA ポリメラーゼ 0.125  $\mu\text{L}$  を混合したもの.

## 2.2 試験方法

### 1) DNA 抽出

試料 1.0 g を 15 mL ポリプロピレン製チューブに量り, 予め 65°C に加温した AP1Buffer 5 mL, RNase A 10  $\mu\text{L}$  及び Proteinase K 60  $\mu\text{L}$  をそれぞれ添加し, 以下通知法に従って抽出操作を実施した.

### 2) PCR 反応

1)で抽出した DNA 抽出原液について濃度を測定し, 水で正確に 10 倍に希釈した溶液 (以下「 $\times 10$  溶液」という.) 及び DNA 濃度 10 ng/ $\mu\text{L}$  の溶液を調製し, PCR 反応に用いるテンプレートとした. このテンプレートをトウモロコシ内在性遺伝子 (Zein) 及び Bt11 検知の場合は 5  $\mu\text{L}$ , *cp4 epsps* 検知の場合には 2.5  $\mu\text{L}$  を 100  $\mu\text{L}$  のプラスチック製チューブに入れた PCR 反応液に加えて PCR 反応に供する試料液とした. また, 同時に, テンプレートに Zein の場合にはトウモロコシから抽出した DNA 溶液 (10 ng/ $\mu\text{L}$ ), Bt11 検知の場合には遺伝子組換えトウモロコシ Bt11 系統から抽出した DNA 溶液 (10 ng/ $\mu\text{L}$ ) 及び *cp4 epsps* 検知の場合には *cp4 epsps* 遺伝子が組み込まれていることが明らかな遺伝子組換えトウモロコシから抽出した DNA 溶液 (10 ng/ $\mu\text{L}$ ) を加えた反応液を調製し陽性コントロール (PC) とした. テンプレートの代わりに水を同量加えたもの及び陽性コントロールの反応液中のプライマー対を水に置き換えたものをそれぞれノーテンプレートコントロール (NTC) 及びノープライマーコントロール (NPC) とした.

調製した試料液, PC, NTC 及び NPC をサーマルサイクラー (Applied Biosystems 製 Gene Amp PCR System9700) にセットし, 以下の反応条件で PCR 反応を実施した.

#### PCR 反応条件

Zein 及び Bt11 系統 : 94°C, 10 分間  $\rightarrow$  [94°C, 25 秒間  $\rightarrow$  62°C, 30 秒間  $\rightarrow$  72°C, 45 秒間] (40 サイクル)  $\rightarrow$  72°C, 7 分間

*cp4 epsps* : 95°C, 10 分間  $\rightarrow$  [95°C, 30 秒間  $\rightarrow$  60°C, 30 秒間  $\rightarrow$  72°C, 30 秒間] (40 サイクル)  $\rightarrow$  72°C, 7 分間

### 3) 電気泳動, 染色及び画像解析

通知法に従って操作した.

## 3 結果及び考察

### 3.1 抽出法の検討

DDGS からの DNA 抽出に当たっては当初, 通知法がそのまま適用できるのではないかと考え, 最初に入手した DDGS 2 点について通知法に従い抽出したところ, 表 1 の結果が得られた.

表 1 従来抽出法による DNA 抽出液

試料名	採取量 (g)	(260-320)/ (280-320)	(260-320)/ (230-320)	濃度 (ng/μL)	絶対量 (ng)
19XA-1	1.02	1.963	0.815	66.25	3312.5
19XA-2	0.97	2.000	0.679	47.50	2375.0
19XB-1	1.03	1.875	0.259	18.75	937.5
19XB-2	1.02	2.250	0.209	11.25	562.5

通知法では、抽出できた DNA 量も少なく、精製度も良くなかった。

DDGS はトウモロコシのデンプンをアルコール発酵してアルコールを抽出した残渣であるので、トウモロコシに比べ、糖類が少なくタンパク質が多いと考えられる。このタンパク質が多いことが DNA 抽出に影響している可能性が考えられたため、最初のインキュベートの際に Proteinase K 60 μL を添加して抽出したところ、表 2 の結果が得られた。

表 2 改良法による DNA 抽出液

試料名	採取量 (g)	(260-320)/ (280-320)	(260-320)/ (230-320)	濃度 (ng/μL)	絶対量 (ng)
19XA-3	0.98	2.157	2.146	1011.25	50562.5
19XA-4	1.00	2.178	2.225	1913.75	95687.5
19XB-3	1.02	2.199	2.066	1575.00	78750.0
19XB-4	1.02	2.194	2.059	1791.25	89562.5

また、それぞれの抽出 DNA 溶液の紫外吸光スペクトルの例を図に示した。

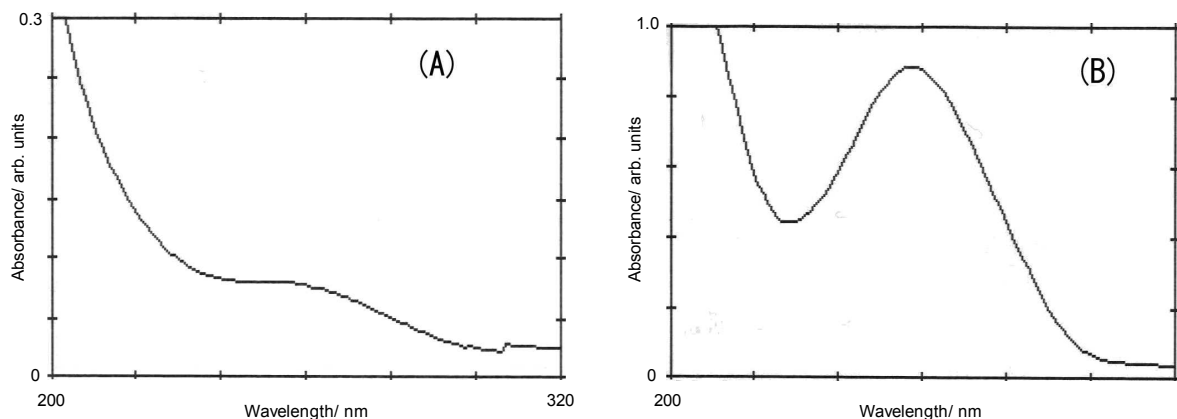


図 DDGS の DNA 抽出液の紫外吸光スペクトルの例

(A) 従来法による DNA 抽出液, (B) 改良法による DNA 抽出液

表 2 及び図 (B) のとおり DNA の抽出量及び精製度も良好であったため、当該方法を改良法として以後試験を実施することとした。

なお、Proteinase K の添加量については、同一試料を用いて 15 及び 30 μL についても試験を実施したが、60 μL の場合と大きな差は見られなかった。しかし、DDGS の品質にバラツキが大きいことが知られているため、今回の試験では余裕を見て添加量を 60 μL とすることとした。

### 3.2 PCR 反応

抽出した DNA で PCR 反応が可能であることを確認するため、トウモロコシ内在性遺伝子 Zein 及び米国で比較的一般的に栽培されているが栽培量が比較的少ないと考えられた遺伝子組換えトウモロコシ Bt11 系統について、PCR 反応を実施した。また、Bt11 系統が検出されなかった試料については、NK603 系統等米国で広く栽培されていると考えられる遺伝子組換えトウモロコシに導入されている *cp4 epsps* 遺伝子について PCR 反応を実施した。

また、通知法では、DNA 濃度を 10 ng/μL に調製した DNA 溶液を用いて PCR 反応を実施することとなっているが、DNA が損傷し断片化している可能性が考えられたため、抽出した濃度によらず、水で 10 倍に希釈した溶液についても PCR 反応を実施することとした。その結果を表 3 に示した。

表 3 DDGS 抽出 DNA の PCR 反応結果

遺伝子等 試料名	トウモロコシ内在性遺伝子			遺伝子組換えに係る遺伝子					
	Zein			Bt11			<i>cp4 epsps</i>		
	10 ng/μL	10倍希釈	20倍希釈	10 ng/μL	10倍希釈	20倍希釈	10 ng/μL	10倍希釈	20倍希釈
19XA	2/2	-	-	0/2	2/2	-	-	-	-
19XB	2/2	-	-	0/2	1/2	-	-	-	-
19XC	2/2	2/2	-	0/2	0/2	-	2/2	2/2	-
19XD	2/2	2/2	-	2/2	2/2	-	-	-	-
19XE	2/2	2/2	-	0/2	0/2	-	1/2	2/2	-
19XF	0/4	1/4	2/4	-	0/1	0/1	-	1/1	1/1
19XG	1/2	2/2	-	0/2	0/2	-	1/2	2/2	-
19XH	2/2	2/2	-	1/2	1/2	-	-	-	-

注：表中の分数は、分母が実施した点数を、分子が検出された点数を表している。「1/2」の場合、2点実施し1点検出されたことを表している。「-」は、試験未実施を表している。

平成 19 年度に収集した米国産 DDGS について改良法により抽出し、PCR 反応を実施したところ、Zein については試験した全ての試料で検出することができた。ただし、試料 19XF については、当初 2 点並行で分析を実施したところ、Zein を検出できなかったため、再度 2 点抽出を実施したところ、1 点 10 倍希釈溶液で検出できた。この検出できた抽出 DNA 原液は、検出できなかったものに比べ抽出量が少なく、他の共存物質による妨害も考えられたため、水で 20 倍に希釈したものについても実施したところ、4 点中 2 点で検出できた（検出できた 2 点中 1 点は 10 倍希釈溶液でも検出できた。）。このため、以後の試験は、検出された溶液で濃度の高い方を用いることとした。

Bt11 系統については、8 点中 4 点で検出できた。なお、DNA 濃度 10 ng/μL の溶液では、8 点中 2 点でしか検出できなかった。

*cp4 epsps* 遺伝子については、Bt11 系統が検出できなかった 4 点について実施し、全てで検出することができた。

以上の結果から、米国産 DDGS から DNA を抽出し、PCR 法により遺伝子組換えに係る遺伝子を検出することは可能であると考えられた。しかし、内在性遺伝子のように必ず含まれる遺伝子の検出が困難なものも存在し、DNA が大きく損傷しているものがあることも示唆された。



飼料の遺伝子組換え体に係る検査は、安全性が確認されていない系統に限られ、これらは事故等により環境中に放出され微量に存在する場合がほとんどである。例えば、Bt10 系統の場合の検出下限は 0.05%程度とされており、実際検査に使用する場合には、更に低濃度のものの検出が可能となるように、さらなる精製又は PCR 反応が不可能な断片の除去等を検討する必要があると考えられた。

#### 文 献

- 1) 農林水産省HP : [www.maff.go.jp/j/council/seisaku/tikusan/bukai/02/pdf/data5.pdf](http://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/tikusan/bukai/02/pdf/data5.pdf) - 2008-02-04
- 2) 米国穀物協会HP : <http://www.grains.org/galleries/DDGS%20User%20Handbook/01%20-%20Introduction.ERE%20draft.pdf>
- 3) 農林水産省生産局長・水産庁長官通知：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について”，平成15年4月1日，14生畜第8598号（2003）.
- 4) Matuoka, T., KURIBARA, H., Takubo, H., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M. and HINO, H.: J. Agric. Food Chem., 50, 2100-2109 (2002).

#### 謝 辞

試料の収集にご協力頂いた，飼料製造業者の皆様に謝意を表します。

## 技術レポート

# 7 コンピューター・プログラムを利用した、複数の動物を検出するプライマーの開発

篠田 直樹\*, 吉田 知太郎\*, 草間 豊子\*

## 1 緒言

牛肉骨粉等の反すう動物由来たん白質の家畜用飼料への混入は、飼料安全法に基づく成分規格等省令<sup>1)</sup>により禁止されている。

反すう動物由来原料の飼料への混入の有無を確認する検査法には、顕微鏡鑑定法、ELISA 法及び PCR 法があり、このうち ELISA 法及び PCR 法は農林水産省生産局長通知<sup>2)</sup>に収載されていた。

PCR 法において、プライマーは特定の動物由来 DNA を高精度に検出し識別するための最も重要な試薬であり、これまで検出対象種ごとにそれぞれのプライマーが開発<sup>3), 4)</sup>され、検査分析に使用されてきた。しかしながら、反すう動物由来 DNA を検出するプライマー対 [rumicon52, rumicon32] は、判定のためアガロースゲルを用い電気泳動した際の PCR 増幅バンドが不鮮明であること、他の動物由来 DNA を検出するプライマーと PCR 反応条件が異なり同時に PCR 反応を行えないこと等の問題があり、これらについて改良が必要と考えられた。

我々は新たに開発したコンピューター・プログラムを利用して、複数の動物を検出するプライマーを効率的に開発する方法を確立し、実例として、反すう動物、ヒツジ、ヤギ及びブタ由来 DNA をそれぞれ特異的に検出する各種のプライマーを開発した。このうち、反すう動物由来 DNA 検出プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] については、その特異性、PCR 増幅バンドの状態及び検出感度を確認したところ、良好な成績が得られたので、その概要を報告する。

## 2 方法

### 2.1 試料

市販の牛用配合飼料、飼料原料（ポークミール、ポークチキンミール、チキンミール、フェザーミール、とうもろこし、魚粉）及び牛肉骨粉をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎して用いた。

なお、検出下限の検討等に用いた配合飼料の配合割合を表 1 に示した。

表 1 試験に用いた配合飼料の配合割合

配合飼料の種類	原材料の区分	割合 (%)	原材料名
肉用牛肥育用 配合飼料	穀類	39	加熱処理とうもろこし、マイロ、玄米
	そうこう類	43	コーングルテンフィード、米ぬか油かす、大豆油かす、ふすま
	植物性油かす	11	なたね油かす
	その他	7	食塩、炭酸カルシウム、ビタミン、ミネラル

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

## 2.2 試験方法

「PCR による飼料中の動物由来 DNA の検査法」<sup>2)</sup>に基づき、「mtDNA エキストラクターCT キット (和光純薬工業製)」を用いて抽出した DNA を鋳型として、以下の組成で PCR を行った。

表 2 PCR 反応液 (20  $\mu$ L/tube) の組成

滅菌超純水	4.7
PCR緩衝液 (PCR Gold buffer (Applied Biosystems製))	2.0
2 mmol/L dNTP mixture (Applied Biosystems製)	2.0
25 mmol/L 塩化マグネシウム (Applied Biosystems製)	1.2
2 $\mu$ mol/L 5'プライマー溶液	4.0
2 $\mu$ mol/L 3'プライマー溶液	4.0
DNA反応用酵素 AmpliTaq Gold (Applied Biosystems製)	0.1
鋳型DNA溶液	2.0
全量	20.0 ( $\mu$ L)

## 3 結果

### 3.1 コンピューター・プログラムによるプライマーの設計

我々の開発した GSPRIMER というプログラムは、PCR の原理上プライマーの 3'末端ほど増幅に寄与することを利用して、標的種間の相同性を 3'末端ほど高くすると共に、非標的種に対する特異性をスコアで表し、プライマー候補をリストアップするものである。例えば反すう動物由来 DNA 検出プライマーの候補は、反すう動物グループ (牛, めん羊, 山羊, 鹿等 20 種) とその他の動物種グループ (馬, 豚, 鶏, ヒト等 14 種) のミトコンドリア DNA の全配列を GSPRIMER で処理することによって得られた。PCR 反応条件については、通知<sup>2)</sup>に記載されている他のプライマー対 (ほ乳, 牛, 鶏, 魚及び植物) と同じ (95°C, 9 分間 → [92°C, 30 秒間 → 55°C, 30 秒間 → 72°C, 30 秒間] (45 サイクル) → 72°C, 5 分間) にした。プログラムの出力に基づき、反すう動物, ヒツジ, ヤギ及びブタ由来 DNA を特異的に検出するプライマーをそれぞれ選択した。プログラム本体, 使用方法及び使用例については別途報告する。

### 3.2 プライマーの特異性

3.1 で選定した各プライマー対について、ウシ (黒毛和種, 褐毛和種, ホルスタイン, アンガス), シカ, エゾシカ, ヒツジ, ヤギ, ヒト, ウマ, ブタ (LW・D 三元交雑種, ミニブタ, メキシカンヘアレスピッグ, バークシャ, 中ヨークシャ, デュロック及びランドレース), ウサギ, ラット, マウス, クジラ, ニワトリ, ウズラ, アイガモ, サケ, カレイ, アジ, タラ, サバ, サンマ, ニジマス, カツオ, マイワシ, カタクチイワシ, キハダマグロ, ケガニ, アサリ, エビ, イカ及びトウモロコシの抽出 DNA を用いて、特異性を確認した。

その結果、各プライマー対は標的動物の抽出 DNA を特異的に増幅し、それぞれ期待された位置に PCR 増幅バンドが検出された。また、標的動物以外の抽出 DNA では、検出を妨害する PCR 増幅バンドは見られなかった。開発したプライマーの試験結果の詳細については別途報告する。

### 3.3 反すう動物由来 DNA 検出プライマーについて

#### 1) 特異性

本研究で開発された反すう動物由来 DNA 検出プライマー [rumicon5D2, rumicon3D5] は、3.2 の動植物の中で、ウシ（黒毛和種、褐毛和種、ホルスタイン、アングス）、シカ、エゾシカ、ヒツジ及びヤギの抽出 DNA では 201 bp の位置に PCR 増幅バンドを示し、その他の抽出 DNA では PCR 増幅バンドが検出されなかった。

また、牛用配合飼料（6 種類）、チキンミール（1 種類）、フェザーミール（2 種類）、ポークチキンミール（3 種類）及び魚粉（6 種類）の市販飼料（反すう動物由来原料を含まないもの）について同様の確認をした結果、反すう動物由来 DNA の検出を妨害する非特異的な PCR 増幅バンドは検出されなかった。

#### 2) 検出下限

牛ミトコンドリア DNA 溶液を希釈し、PCR 反応液 20  $\mu$ L あたり 10.0, 1.0, 0.1, 0.01, 0.001 及び 0.0001 ng の牛ミトコンドリア DNA を含有するよう調製し、PCR 反応を行った。その結果、プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] は、PCR チューブあたり 0.0001 ng の DNA 量まで検出可能であった。

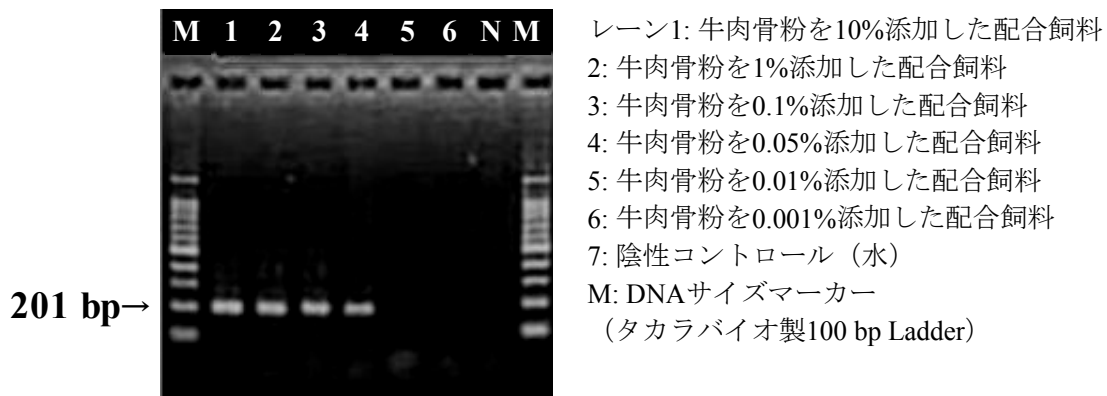
また、牛用配合飼料、豚肉骨粉、魚粉及びとうもろこしに牛肉骨粉をそれぞれ 1.0, 0.1, 0.05, 0.01 及び 0.001%含有させた試料を用いて、それぞれ 2 点並行分析を行い、検出下限を確認した。その結果、プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] の検出下限は各飼料に添加した牛肉骨粉として 0.05~0.01%程度であった。

#### 3) 共同試験

飼料中の反すう動物由来 DNA 検出法の再現精度を確認するため、共通試料を用いた共同試験を行った。

2.1 で示した牛用配合飼料及び豚肉骨粉中に、牛肉骨粉をそれぞれ 1%及び 0.1%添加した試料及び無添加の試料から抽出した DNA 溶液を鋳型として、プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] を用いた PCR を 5 試験室において 2 回行った。その結果、すべての試験室において、牛肉骨粉をそれぞれ 1%及び 0.1%添加した試料から抽出した DNA 溶液では 201 bp の位置に PCR 増幅バンドが検出され、牛肉骨粉を無添加の試料から抽出した DNA 溶液では PCR 増幅バンドは検出されなかった。

図 1 泳動写真例（反すう動物由来 DNA 検出プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5]）



#### 4 考 察

本研究では、複数の動物を検出するプライマーを効率的に開発する方法を確立した。平成 17 年 2 月の省令改正<sup>1)</sup>により豚肉骨粉等の飼料への使用が一部解禁になったように、今後も BSE のリスクが明らかになるにつれて規制される動物種は変更される可能性がある。我々の方法は、規制される種の変更に柔軟に対応し、迅速かつ効率的にスクリーニング用プライマーを開発するのに有用である。

#### 5 ま と め

- 1) 新たに開発したプログラム GSPRIMER を利用して、複数の動物を検出するプライマーを効率的に開発する方法を確立した。
- 2) 設計した反すう動物、ヒツジ、ヤギ及びブタ由来 DNA 検出プライマーについて 40 種の動植物に対する特異性を確認したところ、良好な結果が得られた。
- 3) 反すう動物由来 DNA 検出用プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] については、40 種の動植物に加えて牛用配合飼料及び各飼料原料に対する特異性を確認したところ、良好な結果が得られた。また、その検出下限は DNA で 0.1 pg, 牛肉骨粉で 0.05~0.01%であった。
- 4) プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] を用いた飼料中の反すう動物由来 DNA 検出法の再現精度を確認するため、5 試験室において共通試料を用いた共同試験を行った結果、良好な結果が得られた。

本研究で示した反すう動物由来 DNA 検出用プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] は平成 20 年 4 月 1 日付けで制定された飼料分析基準<sup>5)</sup>に収載された。また、同プライマーについては、平成 20 年 1 月に独立行政法人農業生物資源研究所と共同で国内特許<sup>6)</sup>を出願した。

#### 文 献

- 1) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).  
改正 農林水産省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令”，平成 17 年 2 月 28 日，農林省令第 15 号 (2005).
- 2) 農林水産省生産局長通知：“飼料中の動物由来たん白質等の検出法について”，平成 14 年 4 月 9 日，14 生畜第 181 号 (2002).  
改正 農林水産省消費・安全局長通知：“「飼料中の動物由来たん白質等の検出法について」の改正について”，平成 18 年 3 月 17 日，17 消安第 12305 号 (2006).  
廃止 平成 20 年 4 月 1 日付で飼料分析基準<sup>5)</sup>に収載され，本通知は廃止された。
- 3) T. Kusama, T. Nomura and K. Kadowaki: J. Food Prot., **67**, 1289 (2004).
- 4) 野村哲也，草間豊子；飼料研究報告，**30**，52 (2005).
- 5) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).  
改正 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) 特許：“動物由来 DNA 検出用プライマー配列”，平成 20 年 1 月 25 日，特願 2008-14900 (2008).

精度管理
------

# 1 平成 19 年度飼料の共通試料による分析鑑定について

小野 雄造<sup>\*1</sup>, 甲斐 茂浩<sup>\*2</sup>, 福中 理絵<sup>\*3</sup>, 杉本 泰俊<sup>\*4</sup>,  
松藤 由貴子<sup>\*5</sup>, 野村 昌代<sup>\*6</sup>, 若宮 洋市<sup>\*6</sup>

## 1 目 的

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

## 2 共通試料の内容

A 試料	中すう育成用配合飼料
B 試料	魚 粉
C 試料	鑑定用飼料原料調製試料
D 試料	子豚育成用プレミックス

## 3 試料の調製

- 3.1 試料の調製年月日 平成 19 年 7 月 6 日  
3.2 調製場所 (独) 農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

### (1) A 試料

粉砕した後, 1 mm の網ふるいを通過させた中すう育成用配合飼料 100 kg を用いて, 以下の手順により試料を調製した。

試料をよく混合した後 9 等分し, その中から 4 区画を取って混合し 4 等分して元に戻す。この操作を表 1 の混合区画表により 7 回繰り返した後, 各区画より一定量ずつとり, 1 袋当たり約 180 g 入りの試料 450 個を調製した。

表 1 混合区画表

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

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

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

<sup>\*3</sup> (独) 農林水産消費安全技術センター仙台センター, 現 同神戸センター大阪事務所

<sup>\*4</sup> (独) 農林水産消費安全技術センター名古屋, 現 同福岡センター

<sup>\*5</sup> (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所, 現 同神戸センター消費技術部

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

## (2) B 試料

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

## (3) C 試料

各原料中の夾雑物を除去し、必要に応じ粉碎した後、表 2 に掲げる 9 種類の原料（総量 100 kg）のうち配合割合が 5%未満の原料を予備配合した。次に、予備配合したものとすべての原料を表 2 の配合割合でよく混合した後、A 試料と同様の操作を行い、1 袋当たり約 180 g 入りの試料 450 個を調製した。

## (4) D 試料

子豚育成用プレミックス 100 kg をよく混合した後、A 試料と同様の操作を行い、1 袋当たり約 180 g 入りの試料 450 個を調製した。

表 2 C 試料の原料及び配合割合

原 料 名	配合割合 (%)	原 料 名	配合割合 (%)
とうもろこし	25	やし油かす	10
大麦	20	魚粉	10
精白米	10	リン酸カルシウム	3
米ぬか油かす	10	食塩	2
なたね油かす	10		

## 4 分析鑑定項目及び実施要領

## (1) 分析鑑定項目

A 試料・・・水分，粗たん白質，粗脂肪，粗繊維，粗灰分，カルシウム，リン及びサリノマイシンナトリウム

B 試料・・・水分，粗たん白質，粗灰分，カドミウム及びエトキシキン

C 試料・・・9 種類の原料の配合割合の推定

D 試料・・・銅，亜鉛及びクエン酸モランテル

## (2) 実施要領

「第 32 回飼料の共通試料による分析鑑定実施要領」（152 ページ）による。

## 5 試料袋間のバラツキ調査

A 試料，B 試料及び D 試料それぞれの 2 分析項目について Thompson らの harmonized protocol<sup>1)</sup>に基づき均質性確認テストを行った。ランダムに抜き取った 10 袋の併行分析の結果は表 3 のとおりであり，その結果から一元配置の分散分析，均質性確認のための計算を行った結果は表 4 のとおりであり，いずれも試料袋間のバラツキは問題なかった。

表 3 A, B 及び D 試料の分析成績

	A試料 粗たん白質 (%)		A試料 粗灰分 (%)		B試料 粗たん白質 (%)		B試料 粗灰分 (%)		D試料 銅 (g/kg)		D試料 亜鉛 (g/kg)	
	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2
1	18.20	18.97	6.86	6.79	62.14	62.02	21.02	21.19	23.96	23.24	26.88	27.21
2	18.34	18.43	6.76	6.82	61.97	61.41	21.20	21.24	23.76	23.97	27.93	27.93
3	18.26	18.58	6.79	6.78	61.14	61.11	21.06	20.92	23.92	23.99	28.29	28.41
4	18.28	18.29	6.80	6.72	61.15	61.38	21.35	21.08	24.10	24.79	27.52	28.84
5	18.23	18.56	6.84	6.72	61.06	61.63	20.87	21.30	24.06	24.47	27.82	28.17
6	18.24	18.27	6.77	6.73	61.05	61.78	20.91	20.46	24.33	24.15	28.12	28.69
7	18.29	18.19	6.79	6.70	61.58	61.77	20.99	21.01	23.96	24.25	27.96	28.50
8	18.21	18.21	6.93	6.86	61.35	61.32	21.05	20.68	24.38	23.92	28.14	28.57
9	18.31	18.27	6.83	6.77	61.37	61.06	20.89	20.96	23.55	23.77	27.65	27.29
10	18.43	18.32	6.85	6.75	61.57	62.07	21.15	21.26	23.51	24.20	27.22	27.79

表 4 A, B 及び D 試料のバラツキ調査

	成分名	要因	偏差平方和	自由度	不偏分散	分散比	$S_s/\sigma^a$
			$S$	$\phi$	$V$	$F_0$	
A試料	粗たん白質	試料間 $A$	0.2243	9	0.0249	0.60	— <sup>b)</sup>
		分析誤差 $E$	0.4177	10	0.0418		
		総計 $T$	0.6421	19			
	粗灰分	$A$	0.0359	9	0.0040	1.43	—
		$E$	0.0280	10	0.0028		
		$T$	0.0639	19			
B試料	粗たん白質	$A$	1.6749	9	0.1861	2.32	—
		$E$	0.8009	10	0.0801		
		$T$	2.4758	19			
	粗灰分	$A$	0.5353	9	0.0595	1.79	—
		$E$	0.3319	10	0.0332		
		$T$	0.8672	19			
D試料	銅	$A$	1.3603	9	0.1511	1.47	—
		$E$	1.0270	10	0.1027		
		$T$	2.3873	19			
	亜鉛	$A$	3.8124	9	0.4236	2.61	—
		$E$	1.6250	10	0.1625		
		$T$	5.4374	19			

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

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



## 6 参加実験室

- (1) 総数 271  
 うち 飼料関係…179  
 飼料添加物関係…21  
 団体等…30  
 検査指導機関…41
- (2) 試料別参加実験室数  
 A 試料…262  
 B 試料…258  
 C 試料…155  
 D 試料…113

## 7 分析鑑定成績及び解析結果

### (1) 分 析

各試料の分析成績は表 5 のとおりであり、ヒストグラムは図 1~16 のとおりである。その解析結果は表 6~8 のとおりである。なお、解析は次のとおり行った。

分析成績の解析は、次のとおりロバスト法により行った。式 1 により NIQR（標準四分位範囲－normalised inter quartile range－頑健な標準偏差）を求めた後、式 2 により、各分析成績の z-スコアを求めた。

$$\text{NIQR} = \frac{(c-a)}{1.349} \dots\dots\dots \text{式 1}$$

$a$  : 上四分位の値  
 $c$  : 下四分位の値

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

$x$  : 各実験室の分析成績  
 $b$  : 中央値

また、異常値と考えられる z-スコアの絶対値が 3 以上の分析値を棄却した後、平均値の 95%信頼区間を求めた。

### (2) 鑑 定

今回は、9 種類の原料を混合調製した試料について、使用した原料の検出と配合割合の推定を実施した。その成績は表 9 及び 10 のとおりであった。







表 5 分析成績 (4)

試料 番号	水分			粗たん白質			粗脂肪			粗繊維			粗灰分			カルシウム			リン			SL (管理分析・フローインジェクション)			SL (HPLC・バイオアッセイ)		
	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)†	No.	z-score	分析値 (g/力価)†	No.	z-score
360	12.83	1	0.30	18.78	2	1.74	4.23	1	1.26	2.73	2	-0.26	6.71	1	0.00	1.49	1	2.47	0.70	1	0.00						
361	12.85	1	0.38	18.38	3	-0.24	4.20	2	1.01	2.51	2	-0.97	6.43	1	-2.51	1.37	1	-0.22	0.71	1	0.67						
362	12.85	1	0.38	18.67	2	1.19							6.80	1	0.80							46.00	1	-1.75			
364	12.86	1	0.42										6.63	1	-0.71												
365	13.23	1	1.85	18.33	3	-0.49	4.24	1	1.34	3.25	3	1.43	6.69	1	-0.17	1.39	2	0.22	0.70	1	0.00				45.93	3	-1.04
366	12.47	1	-1.07										6.82	1	0.98	1.32	2	-1.34	0.70	1	0.00						
367	12.14	1	-2.35	18.57	2	0.69	3.63	1	-3.79				6.44	1	-2.42												
368	12.48	1	-1.04	18.23	4	-0.99	4.07	1	-0.08				6.99	1	2.51												
369	12.62	1	-0.50	18.54	3	0.54	3.87	2	-1.77	2.68	3	-0.42	6.65	1	-0.53	1.49	2	2.47	0.67	1	-2.02						
370	12.80	1	0.19	18.31	4	-0.59	4.00	1	-0.67	2.76	2	-0.16	6.67	1	-0.35	1.33	2	-1.12	0.70	1	0.00						
372	12.87	1	0.46	18.70	4	1.34	4.01	1	-0.59	3.84	2	3.34	6.66	1	-0.44	1.33	2	-1.12	0.70	1	0.00	56.25	1	3.22			
373	12.82	1	0.26	18.27	3	-0.79	4.09	1	0.08	3.18	3	1.20	6.76	1	0.44	1.37	2	-0.22	0.70	1	0.00						
374	12.17	1	-2.23	18.57	1	0.69	4.07	1	-0.08				6.49	1	-1.97				1.68	1	6.61						
375	12.82	1	0.26	18.44	1	0.04							6.69	1	-0.17							46.30	2	-1.60			
376	12.64	1	-0.42	18.49	2	0.29	4.20	1	1.01				6.86	1	1.34	1.41	2	0.67	0.70	1	0.00						
377	12.52	1	-0.88	18.26	4	-0.84	3.80	1	-2.36	2.57	2	-0.78	6.77	1	0.53	1.46	2	1.79	0.68	1	-1.34				52.08	1	1.19
378	12.99	1	0.92	18.30	4	-0.64	4.10	1	0.16	3.00	2	0.61	6.73	1	0.17	1.33	2	-1.12	0.72	1	1.34						
379	12.40	1	-1.34	18.10	4	-1.64	3.60	1	-4.04				6.80	1	0.80												
380	13.05	1	1.15	18.22	4	-1.04	4.02	1	-0.50	2.75	2	-0.19	6.74	1	0.26	1.41	2	0.67	0.71	1	0.67				49.80	3	0.44
381	12.77	1	0.07	18.61	4	0.89	4.35	2	2.27	2.26	1	-1.78	6.81	1	0.89	1.42	2	0.89	0.71	1	0.67						
382	12.83	1	0.30	18.67	4	1.19	4.07	1	-0.08	3.10	3	0.94	6.35	1	-3.23	1.17	1	-4.72	0.72	1	1.34				51.08	3	0.92
383																											
384	12.64	1	-0.42	18.66	2	1.14	4.12	1	0.33	3.01	2	0.65	6.61	1	-0.89	1.37	2	-0.22	0.70	1	0.00	49.80	1	0.09			
385	12.72	1	-0.11	18.31	4	-0.59	4.17	1	0.75	2.76	1	-0.16	6.48	1	-2.06												
386	12.98	1	0.88																			49.90	1	0.14			
387	12.57	1	-0.69	17.46	2	-4.84	4.66	1	4.89	3.04	1	0.74	6.81	1	0.89				0.70	1	0.00						
388	12.59	1	-0.61	18.30	2	-0.64	4.05	1	-0.25	2.62	1	-0.61	6.73	1	0.17	1.34	1	-0.89	0.69	1	-0.67				53.00	1	1.64
389	12.85	1	0.38	18.34	4	-0.44	4.00	1	-0.67	2.74	2	-0.22	6.71	1	0.00	1.41	2	0.67	0.70	1	0.00				49.25	2	-0.17
390	12.70	1	-0.19	18.45	2	0.09	4.08	1	0.00	2.75	2	-0.19	6.75	1	0.35	1.38	2	0.00	0.70	1	0.00				50.30	4	0.63
427	13.12	1	1.42	18.50	4	0.34	4.04	1	-0.33	2.67	1	-0.45	6.74	1	0.26	1.39	2	0.22	0.71	1	0.67	50.90	2	0.62	48.50	4	-0.05

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

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

サリノマイシンナトリウム

No. 分析方法

- 1 管理分析法
- 2 フローインジェク  
ション法
- 3 HPLC法
- 4 バイオアッセイ



表 5 分析成績 (6)

Table with 18 columns: 試料番号, 水分, 粗たん白質, 粗灰分, カドミウム, エトキシキン, 銅, 亜鉛, クエン酸モランテール. Rows 129 to 221.





表 5 分析成績 (8)

試料 番号	B試料			D試料			D試料			D試料			D試料											
	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	エトキシキン 分析値 (mg/kg)	No.	z-score	銅 分析値 (g/kg)	No.	z-score	亜鉛 分析値 (g/kg)	No.	z-score	クエン酸モランテル 分析値 (g/kg)	No.	z-score
360	8.83	1	-0.12	61.44	2	0.83	21.01	1	-0.35															
361	9.02	1	1.04	60.93	3	-0.07	20.93	1	-0.83				85.10	1	2.46									
362	8.72	1	-0.79	61.74	2	1.37	20.95	1	-0.71															
364																								
365	9.23	1	2.33	60.78	3	-0.33	21.07	1	0.00															
366	8.57	1	-1.71				21.08	1	0.05	1.10	2	0.22				23.90	1	0.84	29.34	1	-0.53			
367	8.38	1	-2.88	61.51	2	0.96	20.89	1	-1.07															
368	8.96	1	0.67	61.30	3	0.58	21.24	1	1.01															
369	9.03	1	1.10	62.18	4	2.16	21.07	1	0.00	1.26	1	2.02	69.80	1	0.52	24.66	1	2.16	28.33	1	-1.53			
370	8.66	1	-1.16	61.28	3	0.55	21.30	1	1.37				59.00	1	-0.85	23.97	1	0.96	31.71	1	1.81	14.00	1	-2.31
372	8.75	1	-0.61	61.16	3	0.33	21.11	1	0.23				36.70	1	-3.69									
373	8.67	1	-1.10	60.90	3	-0.12	21.27	1	1.19															
374	8.39	1	-2.82	60.85	1	-0.21	21.02	1	-0.29															
375	8.94	1	0.55	61.19	1	0.39	20.75	1	-1.91															
376	8.42	1	-2.63	61.45	2	0.85	21.06	1	-0.05															
377	9.01	1	0.98	60.38	3	-1.05	21.14	1	0.41	1.40	1	3.59	59.20	1	-0.82	25.92	1	4.34	30.31	1	0.42	15.20	1	-1.15
378	8.94	1	0.55	60.30	3	-1.19	21.10	1	0.17															
379	8.72	1	-0.79	58.63	2	-4.18	21.10	1	0.17															
380	8.93	1	0.49	60.91	3	-0.10	21.24	1	1.01	1.27	1	2.13				24.55	1	1.97						
381	8.87	1	0.12	60.71	3	-0.46	21.03	1	-0.23							24.77	1	2.35	28.95	1	-0.92	16.10	1	-0.28
382	8.96	1	0.67	61.18	3	0.37	20.92	1	-0.89															
383	8.90	1	0.30	62.29	3	2.35	20.87	1	-1.19															
384	8.87	1	0.12	61.73	2	1.35	20.84	1	-1.37	1.02	2	-0.67	52.60	1	-1.66	23.40	1	-0.01	30.70	1	0.81	19.40	1	2.89
385	8.91	1	0.36	61.50	3	0.94	20.66	1	-2.45															
386													63.50	1	-0.27	23.14	1	-0.46	29.47	1	-0.40	16.30	1	-0.09
387	8.73	1	-0.73	60.49	2	-0.85	21.07	1	0.00				60.60	1	-0.64	23.42	1	0.01	30.63	1	0.74			
388	8.93	1	0.49	60.95	2	-0.03	21.34	1	1.61							24.26	1	1.47	30.62	1	0.73			
389	8.99	1	0.85	60.56	3	-0.73	21.06	1	-0.05															
390	8.83	1	-0.12	60.52	2	-0.80	21.01	1	-0.35	1.08	2	0.00	61.28	1	-0.56	23.91	1	0.86	30.44	1	0.55	15.00	1	-1.34
427	9.04	1	1.16	61.44	4	0.83	20.97	1	-0.59	0.99	1	-1.01	70.70	1	0.63	23.69	1	0.48	30.69	1	0.80	17.30	1	0.86

注1: z-scoreの欄に下線を付したものは、絶対値が3以上であるもの

注2: 各試料のNo.欄は、分析法を示す。対応は以下のとおりである。

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

クエン酸モランテル

No. 分析方法

1 HPLC法

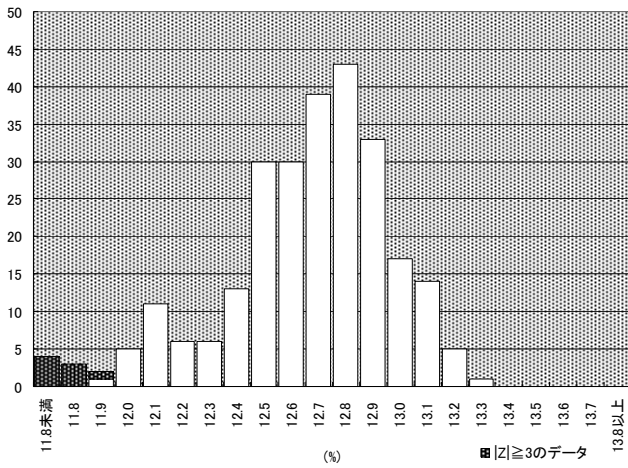


図1 水分の分析成績 (A 試料)

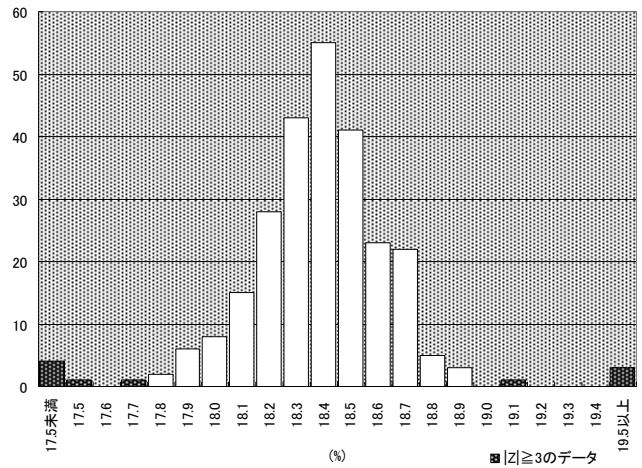


図2 粗たん白質の分析成績 (A 試料)

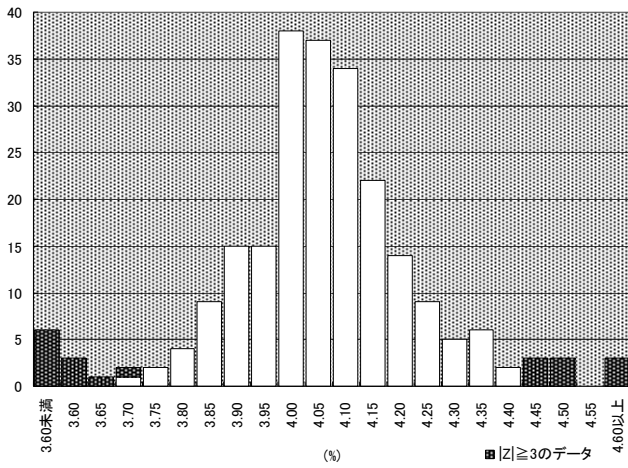


図3 粗脂肪の分析成績 (A 試料)

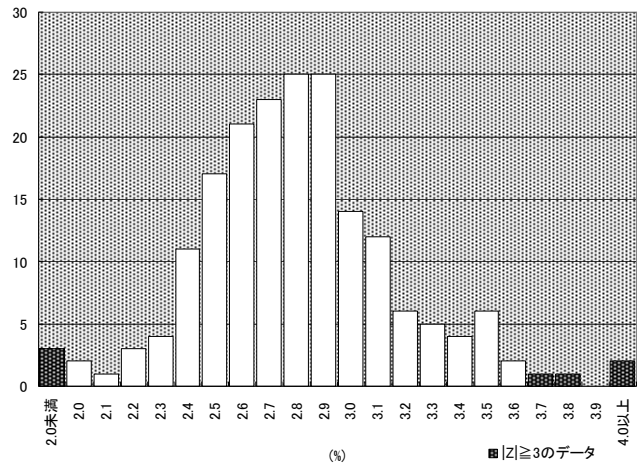


図4 粗繊維の分析成績 (A 試料)

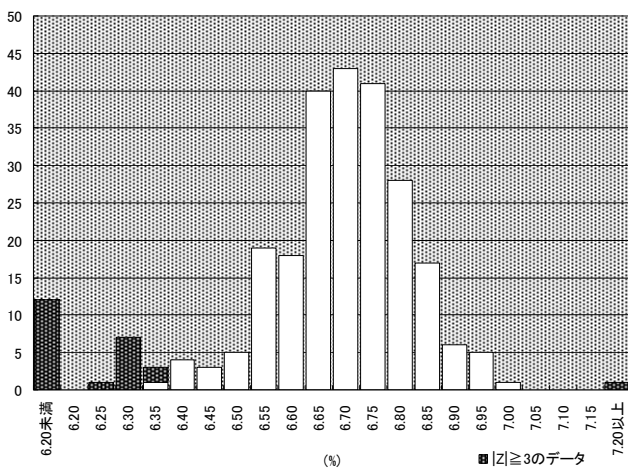


図5 粗灰分の分析成績 (A 試料)

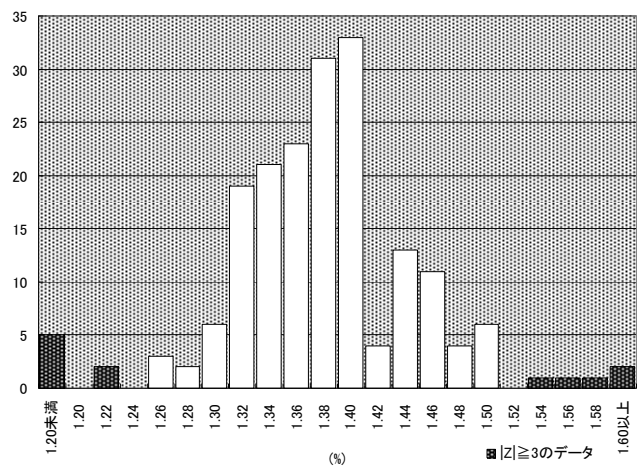


図6 カルシウムの分析成績 (A 試料)

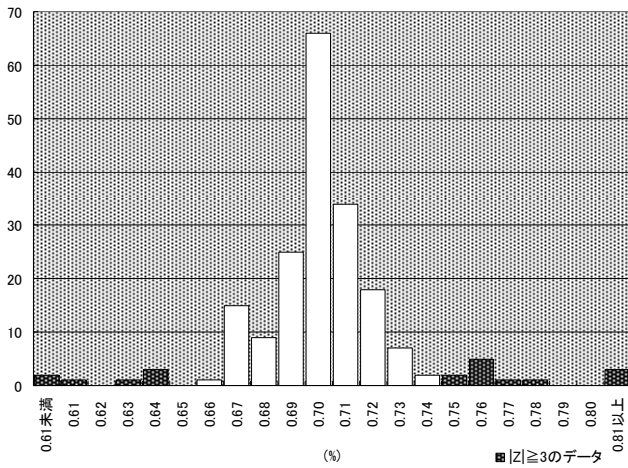


図 7 リンの分析成績 (A 試料)

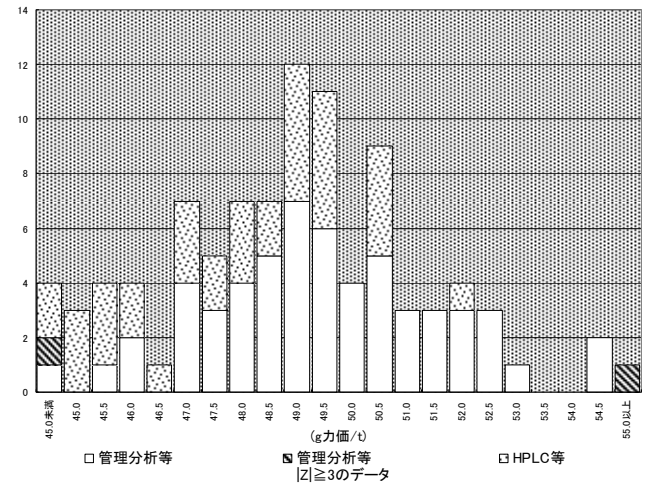


図 8 サリノマイシンナトリウムの分析成績 (A 試料)

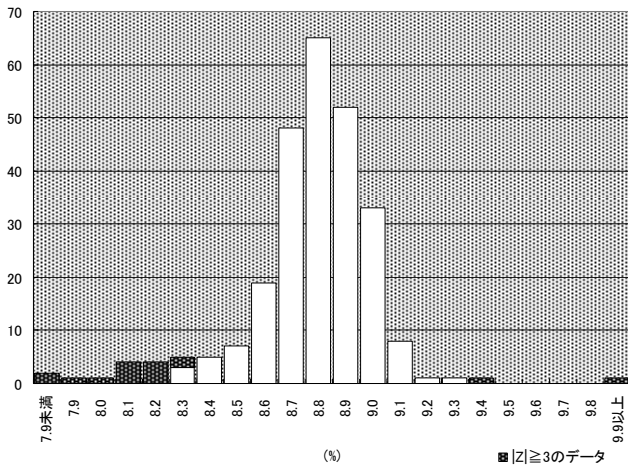


図 9 水分の分析成績 (B 試料)

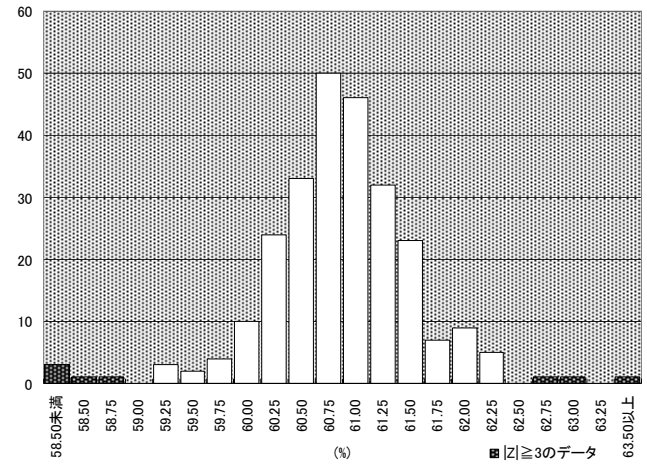


図 10 粗たん白質の分析成績 (B 試料)

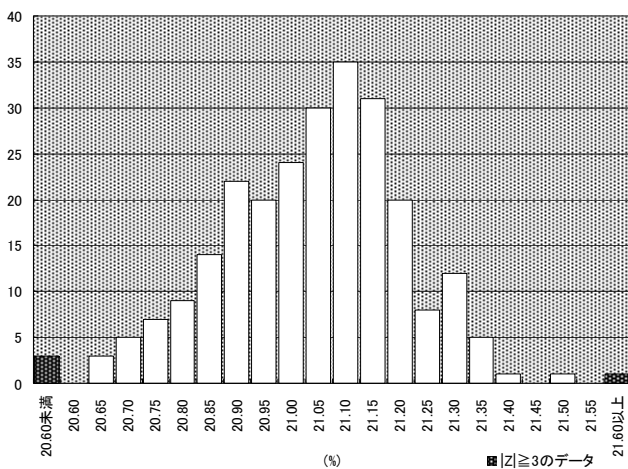


図 11 粗灰分の分析成績 (B 試料)

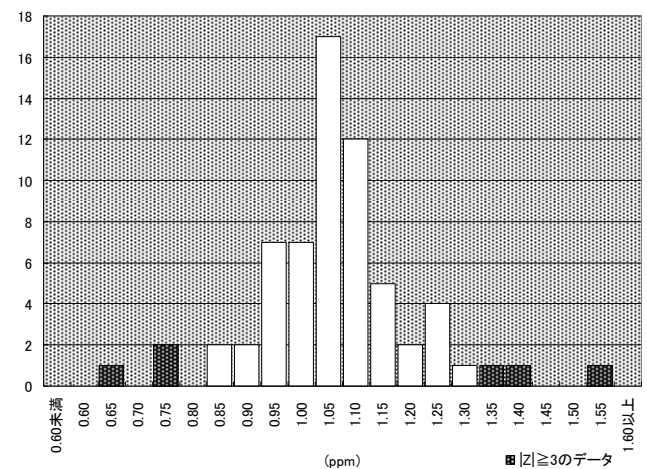


図 12 カドミウムの分析成績 (B 試料)

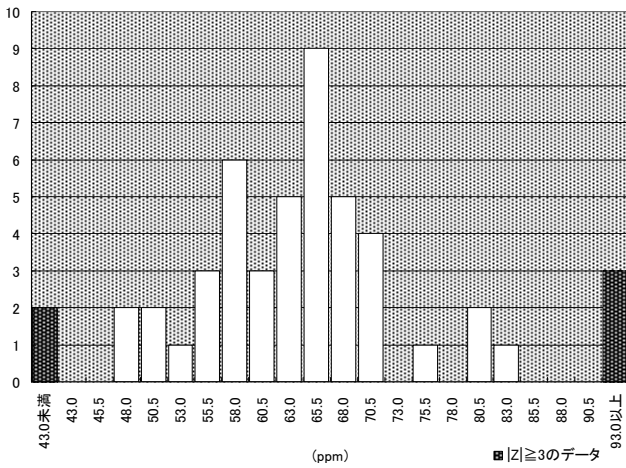


図 13 エトキシキンの分析成績 (B 試料)

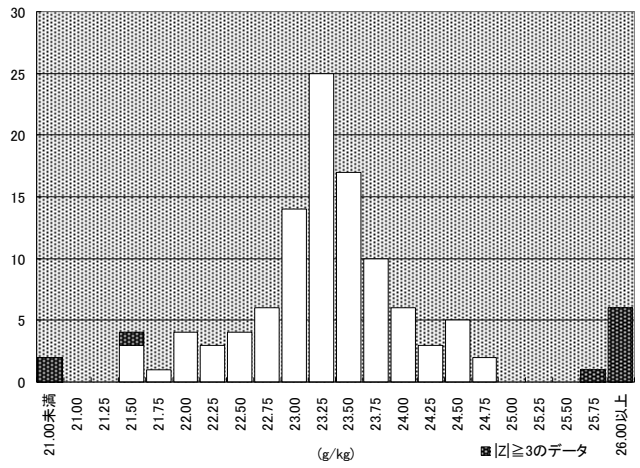


図 14 銅の分析成績 (D 試料)

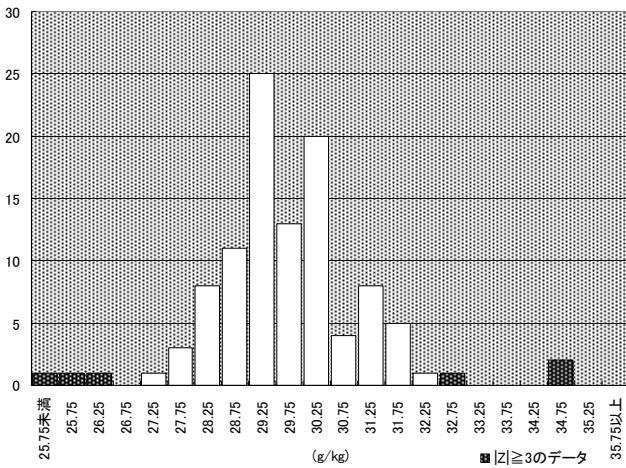


図 15 亜鉛の分析成績 (D 試料)

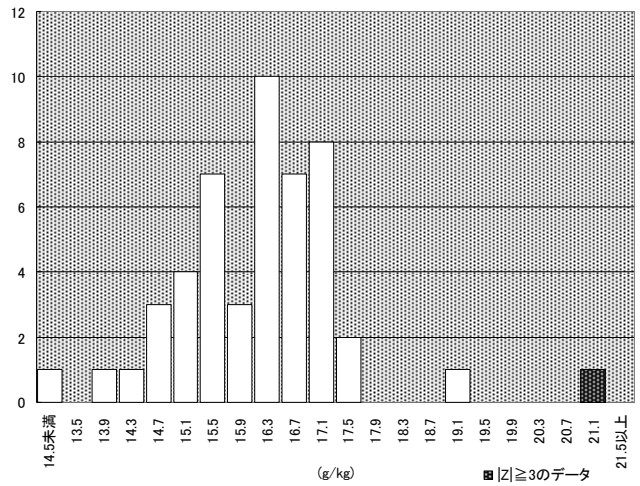


図 16 クエン酸モランテルの分析成績 (D 試料)

表 6 A 試料の解析結果

区 分 <sup>注1</sup>	水分	粗たん白質	粗脂肪	粗繊維	粗灰分
データ数	262	261	233	188	254
1 中央値	12.75	18.43	4.08	2.81	6.71
下限境界値 <sup>注2</sup>	11.97	17.83	3.72	1.89	6.38
上限境界値	13.53	19.03	4.44	3.73	7.04
2 平均値	12.73	18.43	4.08	2.84	6.72
95%信頼区間	12.69~12.76	18.40~18.45	4.06~4.09	2.80~2.89	6.71~6.73

区 分	カルシウム	リン	SL (管理分析等) <sup>注3</sup>	SL (HPLC等) <sup>注4</sup>
データ数	188	196	59	36
1 中央値	1.38	0.70	49.6	48.7
下限境界値 <sup>注2</sup>	1.25	0.66	43.4	40.8
上限境界値	1.51	0.74	55.8	56.5
2 平均値	1.39	0.70	49.7	48.5
95%信頼区間	1.38~1.39	0.70~0.70	49.2~50.3	47.8~49.2

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

2  $z$ -スコアの絶対値が 3 の境界値である。

3 SL (管理分析等) は，サリノマイシンナトリウムの管理分析及びフローインジェクション法を集計した結果である。

4 SL (HPLC 等) は，サリノマイシンナトリウムの HPLC 法及びバイオアッセイを集計した結果である。

表 7 B 試料の解析結果

区 分 <sup>注1</sup>	水分	粗たん白質	粗灰分	カドミウム	エトキシキン
データ数	258	256	251	65	49
1 中央値	8.85	60.97	21.07	1.08	65.7
下限境界値 <sup>注2</sup>	8.36	59.29	20.57	0.81	42.1
上限境界値	9.34	62.65	21.57	1.35	89.3
2 平均値	8.85	61.00	21.06	1.08	64.6
95%信頼区間	8.83~8.87	60.93~61.07	21.04~21.08	1.06~1.10	62.2~66.9

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

2  $z$ -スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 8 D 試料の解析結果

区分 <sup>注1</sup>	銅	亜鉛	クエン酸モランテル
データ数	113	105	49
1 中央値	23.41	29.88	16.4
1 下限境界値 <sup>注2</sup>	21.68	26.86	13.3
1 上限境界値	25.14	32.90	19.5
2 平均値	23.38	29.93	16.2
2 95%信頼区間	23.26~23.51	29.72~30.14	16.0~16.5

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

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 9 原料別検出状況

原料名	配合割合 (%)	実験室数					不検出	検出率 (%)
		検出						
		多量	中量	少量	検出のみ	計		
とうもろこし	25	153	1	0	1	155	0	100
大麦	20	109	36	1	1	147	8	95
精白米	10	34	102	12	1	149	6	96
米ぬか油かす	10	2	49	40	0	91	64	59
なたね油かす	10	17	123	13	1	154	1	99
やし油かす	10	2	52	34	1	89	66	57
魚粉	10	1	56	91	1	149	6	96
リン酸カルシウム	3	0	0	89	1	90	65	58
食塩	2	0	1	147	1	149	6	96

表 10 配合したもの以外に検出と報告された原料

検出物名	多量	中量	少量	検出のみ	計
あまに油かす	0	1	1	0	2
アルファルファミール	0	1	2	0	3
かき殻	0	0	3	0	3
かに殻粉末	0	1	2	0	3
カボック油かす	0	1	1	0	2
玄米	1	2	0	0	3
コーングルテンフィード	0	2	1	0	3
コーングルテンミール	0	1	1	0	2
ごま油かす	0	2	6	0	8
小麦	5	5	5	0	15
スクリーニングペレット	0	1	1	0	2
ゼオライト	0	0	2	0	2
大豆油かす	0	28	20	1	49
炭酸カルシウム	0	1	50	1	52
チキンミール	0	3	6	0	9
肉骨粉	0	0	5	0	5
ビートパルプ	0	0	1	0	1
ビールかす	0	2	1	0	3
フェザーミール	0	0	1	0	1
ふすま	1	12	12	2	27
ホミニーフード	0	1	0	0	1
マイロ	1	2	1	0	4
麦ぬか	0	1	2	0	3
ライ麦	0	3	2	0	5

## 8 まとめ

### (1) A 試料 (中すう育成用配合飼料)

#### 1) 水分

262 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 8 件であった。  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 12.73%、95%信頼区間が 12.69~12.76%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 255 件、平均値が 12.69%、標準偏差が 0.35%及び相対標準偏差が 2.8%であった。

水分測定器を使用した試験では、データ数が 6 件、平均値が 12.75%、標準偏差が 0.35%及び相対標準偏差が 2.8%であった。

その他の方法 (近赤外分析法) によるデータ数が 1 件あった。

#### 2) 粗たん白質

261 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 10 件であった。  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 18.43%、95%信頼区間が 18.40~18.45%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

硫酸標準液吸収法による試験では、データ数が 35 件、平均値が 18.58%、標準偏差が 0.47%及び相対標準偏差が 2.6%であった。

ホウ酸溶液吸収法による試験では、データ数が 51 件、平均値が 18.34%、標準偏差が 0.38%及び相対標準偏差が 2.1%であった。

自動分析機を使用した試験では、データ数が 157 件、平均値が 18.39%、標準偏差が 0.26%及び相対標準偏差が 1.4%であった。

燃焼法による試験では、データ数が 17 件、平均値が 18.57%、標準偏差が 0.26%及び相対標準偏差が 1.4%であった。

その他の方法 (近赤外分析法) によるデータ数が 1 件あった。

#### 3) 粗脂肪

233 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 20 件であった。  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 4.08%、95%信頼区間が 4.06~4.09%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 172 件、平均値が 4.11%、標準偏差が 0.19%及び相対標準偏差が 4.6%であった。

自動分析機を使用した試験では、データ数が 58 件、平均値が 3.95%、標準偏差が 0.22%及び相対標準偏差が 5.7%であった。

その他の方法 (近赤外分析法等) によるデータ数が 3 件あった。



## 4) 粗繊維

188 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 7 件であった。  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 2.84%、95%信頼区間が 2.80~2.89%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準・静置法による試験では、データ数が 28 件、平均値が 2.95%、標準偏差が 1.20%及び相対標準偏差が 40.6%であった。

飼料分析基準・ろ過法による試験では、データ数が 116 件、平均値が 2.75%、標準偏差が 0.30%及び相対標準偏差が 11.1%であった。

自動分析機を使用した試験では、データ数が 40 件、平均値が 3.16%、標準偏差が 0.30%及び相対標準偏差が 13.4%であった。

その他の方法によるデータ数が 4 件あった。

## 5) 粗灰分

254 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 23 件であった。  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 6.72%、95%信頼区間が 6.71~6.73%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による分析では、データ数が 249 件、平均値が 6.73%、標準偏差が 0.90%及び相対標準偏差が 13.5%であった。

その他の方法（実施要領とは異なる灰化方法等）によるデータ数が 5 件あった。

## 6) カルシウム

188 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 12 件であった。  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 1.39%、95%信頼区間が 1.38~1.39%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

シュウ酸アンモニウム法による分析では、データ数が 40 件、平均値が 1.38%、標準偏差が 0.10%及び相対標準偏差が 6.9%であった。

原子吸光光度法による分析では、データ数が 139 件、平均値が 1.38%、標準偏差が 0.07%及び相対標準偏差が 5.4%であった。

その他の方法（キレート滴定法等）によるデータ数が 9 件あった。

## 7) リン

196 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 19 件であった。  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 0.70%、95%信頼区間が 0.70~0.70%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 186 件、平均値が 0.71%、標準偏差が 0.08%及び相対標準偏差が 10.8%であった。

その他の方法（JIS K0102 等）によるデータ数が 10 件あった。

#### 8) サリノマイシンナトリウム

今回の試験ではサリノマイシンナトリウム無添加試料の配布がなく、その差を差し引くことになっていないため、管理分析及びフローインジェクションによる試験と HPLC 及びバイオアッセイによる試験とで差が生じることが考えられ、両者を分けて集計した。

管理分析及びフローインジェクションによる試験では、59 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 2 件であった。 $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 49.7 g(力価)/トン、95%信頼区間が 49.2~50.3 g(力価)/トンであった。

HPLC 及びバイオアッセイによる試験では、36 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータはなかった。 $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 48.5 g(力価)/トン、95%信頼区間が 47.8~49.2 g(力価)/トンであった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

管理分析法による試験では、データ数が 48 件、平均値が 49.7 g(力価)/トン、標準偏差が 2.5 g(力価)/トン及び相対標準偏差が 5.1%であった。

フローインジェクション法による試験では、データ数が 11 件、平均値が 49.9 g(力価)/トン、標準偏差が 2.1 g(力価)/トン及び相対標準偏差が 4.2%であった。

HPLC 法による試験では、データ数が 28 件、平均値が 48.1 g(力価)/トン、標準偏差が 2.2 g(力価)/トン及び相対標準偏差が 4.6%であった。

バイオアッセイによる試験では、データ数が 8 件、平均値が 49.7 g(力価)/トン、標準偏差が 1.4 g(力価)/トン及び相対標準偏差が 2.8%であった。

### (2) B 試料（魚粉）

#### 1) 水分

258 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 16 件であった。 $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 8.85%、95%信頼区間が 8.83~8.87%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 251 件、平均値が 8.81%、標準偏差が 0.27%及び相対標準偏差が 3.1%であった。

水分測定器を用いた試験では、データ数が 6 件、平均値が 9.02%、標準偏差が 0.23%及び相対標準偏差が 2.5%であった。

その他の方法（近赤外分析法）によるデータ数が 1 件あった。

#### 2) 粗たん白質

256 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 8 件であった。 $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 61.00%、95%信頼区間が 60.93~61.07%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法による試験では、データ数が 34 件、平均値が 60.96%、標準偏差が 0.78%及び相対標準偏差が 1.3%であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法による試験では、データ数が 51 件、平均値が 60.79%、標準偏差が 0.81%及び相対標準偏差が 1.3%であった。

自動分析機を用いた試験では、データ数が 124 件、平均値が 60.93%、標準偏差が 0.99%及び相対標準偏差が 1.6%であった。

燃焼法による試験では、データ数が 47 件、平均値が 61.16%、標準偏差が 0.75%及び相対標準偏差が 1.2%であった。

### 3) 粗灰分

251 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 4 件であった。 $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 21.06%、95%信頼区間が 21.04~21.08%であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 24 件、平均値が 21.09%、標準偏差が 0.54%及び相対標準偏差が 2.2%であった。

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

### 4) カドミウム

65 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 6 件であった。 $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 1.08 mg/kg、95%信頼区間が 1.06~1.10 mg/kg であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

溶媒抽出法による試験では、データ数が 29 件、平均値が 1.13 mg/kg、標準偏差が 0.14 mg/kg 及び相対標準偏差が 12.3%であった。

簡易法による試験では、データ数が 29 件、平均値が 1.06 mg/kg、標準偏差が 0.11 mg/kg 及び相対標準偏差が 10.1%であった。

その他の方法によるデータ数が 7 件あった。

### 5) エトキシキン

49 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 5 件であった。 $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 64.6 mg/kg、95%信頼区間が 62.2~66.9 mg/kg であった。

なお、分析方法はすべて飼料分析基準（HPLC 法）による試験であり、標準偏差が 12.3 mg/kg 及び相対標準偏差が 18.6%であった。

## (3) D 試料（プレミックス）

### 1) 銅

113 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 10 件であった。 $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 23.38 g/kg、

95%信頼区間が 23.26~23.51 g/kg であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 106 件、平均値が 23.46 g/kg、標準偏差が 0.99 g/kg 及び相対標準偏差が 4.2%であった。

その他の方法（ICP 法等）によるデータ数が 7 件あった。

## 2) 亜鉛

105 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 6 件であった。 $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 29.93 g/kg、95%信頼区間が 29.72~30.14 g/kg であった。

なお、集計されたデータの中の各分析方法による解析結果は以下のとおりであった。

飼料分析基準による試験では、データ数が 99 件、平均値が 30.02 g/kg、標準偏差が 1.36 g/kg 及び相対標準偏差が 4.5%であった。

その他の方法（ICP 法等）によるデータ数が 6 件あった。

## 3) クエン酸モランテル

49 実験室から分析値の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上になったデータは 1 件であった。 $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のデータを除いた平均値が 16.2 g/kg、95%信頼区間が 16.0~16.5 g/kg であった。

なお、分析方法はすべて飼料分析基準（HPLC 法）による試験であり、標準偏差が 1.25 g/kg 及び相対標準偏差が 7.7%であった。

## (4) C 試料（鑑定用試料）

### 鑑 定

9 種類の配合された原料の検出とその配合割合の推定を行うこととした。155 実験室より報告があり、配合した 9 種類の他に 24 種類の原料が報告された。

配合した原料について、とうもろこし（配合率 25%）では、155 実験室（検出率 100%）から報告があり、その内訳は多量（15%以上、以下同じ）と報告した実験室が 153、中量（5~15%、以下同じ）と報告した実験室が 1、検出したものの量の報告がなかった実験室が 1 であった。

大麦（配合率 20%）では、147 実験室（検出率 95%）から報告があり、その内訳は多量と報告した実験室が 109、中量と報告した実験室が 36、少量と報告した実験室が 1、検出したものの量の報告がなかった実験室が 1 であった。

精白米（配合率 10%）では、149 実験室（検出率 96%）から報告があり、その内訳は多量と報告した実験室が 34、中量と報告した実験室が 102、少量と報告した実験室が 12、検出したものの量の報告がなかった実験室が 1 であった。

米ぬか油かす（配合率 10%）では、91 実験室（検出率 59%）から報告があり、その内訳は多量と報告した実験室が 2、中量と報告した実験室が 49、少量と報告した実験室が 40 であった。

なたね油かす（配合率 10%）では、154 実験室（検出率 99%）から報告があり、その内訳は

多量と報告した実験室が 17, 中量と報告した実験室が 123, 少量と報告した実験室が 13, 検出したものの量の報告がなかった実験室が 1 であった。

やし油かす（配合率 10%）では, 89 実験室（検出率 57%）から報告があり, その内訳は多量と報告した実験室が 2, 中量と報告した実験室が 52, 少量と報告した実験室が 34, 検出したものの量の報告がなかった実験室が 1 であった。

魚粉（配合率 10%）では, 149 実験室（検出率 96%）から報告があり, その内訳は多量と報告した実験室が 1, 中量と報告した実験室が 56, 少量と報告した実験室が 91, 検出したものの量の報告がなかった実験室が 1 であった。

リン酸カルシウム（配合率 3%）では, 90 実験室（検出率 58%）から報告があり, その内訳は少量と報告した実験室が 89, 検出したものの量の報告がなかった実験室が 1 であった。

食塩（配合率 2%）では, 149 実験室（検出率 96%）から報告があり, その内訳は中量と報告した実験室が 1, 少量と報告した実験室が 147, 検出したものの量の報告がなかった実験室が 1 であった。

誤って検出したものについては, 炭酸カルシウムが最も多く, 52 実験室から報告があった。次いで, 大豆油かすが 49 実験室, ふすまが 27 実験室, 小麦が 15 実験室の順で多く報告された。

## 文 献

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

(参考)

## 第 32 回飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領

### 1. 目的

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

### 2. 共通試料の内容

- A 試料…中すう育成用配合飼料
- B 試料…魚粉
- C 試料…鑑定用飼料原料調製試料
- D 試料…子豚育成用プレミックス

### 3. 分析・鑑定項目

- A 試料・・・水分，粗たん白質，粗脂肪，粗繊維，粗灰分，カルシウム，リン及びサリノマイシンナトリウム
- B 試料・・・水分，粗たん白質，粗灰分，カドミウム及びエトキシキン
- C 試料・・・9種類の原料の配合割合の推定
- D 試料・・・銅，亜鉛及びクエン酸モランテル

### 4. 分析・鑑定要領

- (1) 試料の分析・鑑定方法は，「飼料分析基準」（平成7年11月15日付け7畜B第1660号畜産局長通知）に定める方法及び「サリノマイシンナトリウム又はモネンシンナトリウムを含む飼料の管理方法」（飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について（昭和53年9月5日付け53畜B第2173号畜産局長通知）の別記）に準拠してください。  
なお，参考までに分析法を添付します。  
また，各分析方法の末尾に，分析試料採取量等の一例を記載しました。
- (2) 上記3.に示した分析・鑑定項目のうち，各実験室において実施可能な項目（1項目でも可）について分析・鑑定を行い，報告してください。
- (3) サリノマイシンナトリウムについて，微生物学的定量法による分析が可能な実験室は，参考までに，微生物学的定量法により分析を実施するようお願いします。
- (4) B 試料のエトキシキンの分析における標準品は，今回配布されたものを使用してください。（当該標準品は冷蔵庫に保管してください。）
- (5) 冷蔵庫に保管した試料は，常温に戻してから供試してください。
- (6) 複数の方法（例えば粗たん白質におけるケルダール法及び燃焼法）で分析した場合は各々のデータを報告してください。

## 5. 分析鑑定成績の報告

(1) 報告は、別添の「第 32 回飼料等の共通試料による分析鑑定成績報告書」の様式により、分析又は鑑定を実施した項目について記載してください。

(2) 分析値は、水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム及びリンについては%で、サリノマイシンナトリウムについては g(力価)/トンで、銅、亜鉛及びクエン酸モランテルについては g/kg で、カドミウム、エトキシキンについては g/トンで表してください。

水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム、リン、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、サリノマイシンナトリウム、エトキシキン及びクエン酸モランテルの分析値は小数点以下第 2 位を四捨五入して同第 1 位まで記入してください。

分析方法及び使用した分析機器等を備考欄の該当する番号に○印を付し、その詳細を例に従って記載してください。

また、分析上の特記事項があれば、その旨も記載してください。

なお、参考のため、クエン酸モランテル及びエトキシキンについては、標準液及び試料溶液のクロマトグラムを各 1 葉添付してください。

(3) 鑑定成績は、検出物欄に検出した原料名を分析鑑定成績報告書(4)の語群から選んで記入し、推定される配合割合は、多量（15%以上）、中量（5～15%）及び少量（5%以下）欄に○印を付して示してください。1%未満と推定される検出物は、検出物欄に記入しないでください。

なお、C 試料には前記のとおり 9 種類の原料が配合されています。

検出方法を検出方法欄の該当する番号に○印を付してください。（複数可）

(4) 一部の成分を別の事業所（研究所等）で実施した場合は、その事業所名を備考欄に記入してください。

(5) 報告書の提出期限及び送付先

平成 19 年 10 月 5 日（金）

【以下略】

## 第 32 回飼料等の共通試料による分析鑑定成績報告書 (様式)

実験室名 \_\_\_\_\_

TEL \_\_\_\_\_

担当者 \_\_\_\_\_

(1) A 試料 分析成績

試料番号 \_\_\_\_\_

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1.飼料分析基準 2.水分測定器 (メーカー) (型式) 3.その他の方法 ( )
粗たん白質	(%)	1.飼料分析基準 (硫酸標準液吸収法) 2.飼料分析基準 (ホウ酸溶液吸収法) 3.飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4.自動分析機 (メーカー) (型式) 5.その他の方法 ( )
粗脂肪	(%)	1.飼料分析基準 2.自動分析機 (メーカー) (型式) 3.その他の方法 ( )
粗繊維	(%)	1.飼料分析基準 (静置法) 2.飼料分析基準 (ろ過法) 3.自動分析機 (メーカー) (型式) 4.その他の方法 ( )
粗灰分	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
カルシウム	(%)	1.飼料分析基準 (シュウ酸アンモニウム法) 2.飼料分析基準 (原子吸光光度法) 3.その他の方法 ( )
リン	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
サリノマイ シン ナトリウム	(g(カ匁)/トン)	1.迅速定量法 2.迅速定量法 (フローインジェクション法) 3.HPLC法 (参考) (g(カ匁)/トン) H P L C (メーカー名) (型式) 検 出 器 (メーカー名) (型式) カ ラ ム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 微生物学的定量法 (参考) (g(カ匁)/トン)



## (2) B 試料 分析成績

試料番号 \_\_\_\_\_

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1.飼料分析基準 2.水分測定機 (メーカー) (型式) 3.その他の方法 ( )
粗たん白質	(%)	1.飼料分析基準 (硫酸標準液吸収法) 2.飼料分析基準 (ホウ酸溶液吸収法) 3.飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4.自動分析機 (メーカー) (型式) 5.その他の方法 ( )
粗灰分	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
カドミウム	(g/ト)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
エトキシキン	(g/ト)	1.飼料分析基準 測定条件 HPLC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 $\mu\text{m}$ ) 2.その他の方法 ( )

## (3) D 試料 分析成績

試料番号 \_\_\_\_\_

分析成分名	分析値	備 考
銅	(g/kg)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
亜鉛	(g/kg)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
クエン酸 モランテル	(g/kg)	1.飼料分析基準 測定条件 HPLC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 $\mu\text{m}$ ) 2.その他の方法 ( )

(4) C 試料 鑑定成績

試料番号 \_\_\_\_\_

検出物 <small>(語群から選択して下さい)</small>	配合割合	検出方法
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )

注) 9種類の原料が配合されています。 多量…15%以上、中量…5~15%、少量…1~5%

検出物の語群

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

(5) 来年度の実施項目等「飼料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。

**調査資料****1 飼料のサルモネラ汚染状況（平成19年度）**

会田 紀雄\*

**A Surveillance of *Salmonella* Contamination in Feeds in 2007**

Norio AITA\*

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

In 2007, a surveillance for *Salmonella* contamination was conducted on 138 samples of feed ingredients and 138 samples of formula feeds, collected from mills of feed ingredient or formula feed. Two (1.4%) of feed ingredient samples were positive and all samples of formula feeds were negative for *Salmonella*. 1.5% of fish meal and 7.7% of meat-and-bone meal (derived from pork and poultry) samples were contaminated with *Salmonella*.

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

**1 緒 言**

独立行政法人農林水産消費安全技術センターでは、昭和51年以来、飼料検査業務の一環として飼料原料等を対象にサルモネラのモニタリングを実施し、その結果を年次報告してきた<sup>1)~33)</sup>。

サルモネラに汚染された飼料の使用によって有害畜産物が生産されること、あるいは家畜等に対する被害によって畜産物の生産が阻害されることを防止する観点に立って、平成10年6月に農林水産省から「飼料製造に係るサルモネラ対策のガイドライン」<sup>34)</sup>が示された。

また、平成10年度から平成14年度にかけて「飼料の安全性確保調査指導事業」を実施し、この中で飼料原料及び配合飼料を対象としたサルモネラのモニタリング調査を行い、その結果を報告してきた<sup>35), 36)</sup>。

この事業を通じたサルモネラ汚染防止対策等の指導により、配合飼料及び飼料原料におけるサルモネラの年度別（平成10~14年度）の陽性率は5%台から1%台にまで減少した<sup>36)</sup>。一方、平成15年度の陽性率は3.5%<sup>30)</sup>で、平成10~14年度の総陽性率3.4%<sup>36)</sup>と同程度であったが、平成16年度は2.0%<sup>31)</sup>、平成17年度は1.5%<sup>32)</sup>と減少したが平成18年度は2.3%<sup>33)</sup>と若干増加した。今回、平成19年度のサルモネラ汚染状況を取りまとめたので、その概要を報告する。

**2 材料及び方法****2.1 材 料**

平成19年4月から平成20年3月までに、（独）農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検

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

査部，同札幌センター，同仙台センター，同名古屋センター，同神戸センター大阪事務所及び同福岡センターが，各管内の飼料原料工場及び配合飼料工場で採取した飼料原料 138 検体（国産 132 検体，輸入 6 検体）及び配混合飼料 138 検体（すべて国産）をモニタリング対象とした。

## 2.2 方法

飼料分析基準<sup>37)</sup>に基づき，次の手順でサルモネラを検出・分離し，血清型を同定した。

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

- i 検体 25 g を緩衝ペプトン水 250 mL に入れ，35~37°C で 18~24 時間前増菌培養した。
- ii 前増菌培養液 10 mL をセレナイトシスチン培地（Difco）及びハーナ・テトラチオン酸塩培地（栄研化学）各 100 mL にそれぞれ加え，41~43°C で 18~24 時間選択増菌培養した。
- iii 各選択増菌培養液 1 白金耳ずつを DHL 寒天培地（栄研化学），ブリリアントグリーン寒天培地（Difco）及びクロモアガーサルモネラ寒天培地（CHROMagar）（又はランバック寒天培地（Merck））にそれぞれ画線塗末し，35~37°C で 18~24 時間選択分離培養した。
- iv 各選択分離培地上のサルモネラと疑われる集落は，TSI 寒天培地（Difco），SIM 寒天培地（栄研化学）及びリジン脱炭酸試験用培地（Difco）を用い，その生化学的性状を確認し，更にサルモネラ各 O 群血清（デンカ生研）との凝集の有無により，陽性，陰性を判定した。
- v 分離したサルモネラは，サルモネラ H 血清（デンカ生研）を用い，血清型別した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 飼料原料の陽性率

#### 1) 種類別の陽性率

モニタリングした飼料原料の種類別の陽性率を Table 1 に示した。

飼料原料は，138 検体中 2 検体が陽性で，その陽性率は 1.4%であった。陽性率は，前々年度の 2.5%，前年度の 3.5%に比べて低い値であった。

飼料原料の区分別の陽性率は，動物質性飼料が 1.7%（前々年度 3.2%，前年度 4.5%）であった。一方，植物性油かす類（前々年度 0%，前年度 0%）及びそうこう類（前々年度 0%，前年度 0%）等は，すべて陰性であった。

飼料原料の種類別の陽性率は，魚粉が 1.5%（前々年度 0%，前年度 4.2%）及び原料混合肉骨粉（豚・鶏原料）が 7.7%（前年度 25%）であった。一方，陽性率が前年度 10%であったフェザーミールを含む，その他の飼料原料等は，すべて陰性であった。

なお，牛に由来する肉骨粉は，平成 13 年 10 月から BSE 防止対策のため，飼料として利用できない<sup>38)</sup>ことから採取していない。

**Table 1 Number and proportion of feed ingredient samples *Salmonella*-positive in 2007**

Feed ingredients	Number of samples examined	Number of samples positive	Proportion positive (%)
<b>Animal protein feed</b>			
Fish meal	65	1	1.5
Poultry by-product meal	25	0	0
Feather meal	10	0	0
Meat and bone meal (derived from pork and poultry)	13	1	7.7
Fish meal and soybean meal mixed feed	1	0	0
Feather meal and soybean meal mixed feed	1	0	0
Fish scales extraction	1	0	0
Fish soluble absorbed feed	1	0	0
Meat and bone meal (derived from pork)	1	0	0
Squid meal	1	0	0
Crab Shell meal	1	0	0
<b>Subtotal</b>	<b>120</b>	<b>2</b>	<b>1.7</b>
<b>Oil seed meal</b>			
Soybean meal	5	0	0
Rapeseed meal	3	0	0
Sesame meal	1	0	0
Molasses absorbed feed	1	0	0
<b>Subtotal</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Bran and food processing by-product</b>			
Wheat bran	1	0	0
Brewer's grain	1	0	0
Corn gluten feed	1	0	0
Corn gluten meal	1	0	0
DDGS	1	0	
Soy sauce cake	1	0	0
<b>Subtotal</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Other</b>			
Sweet potato	1	0	0
Soybean protein concentrate	1	0	0
<b>Subtotal</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Total</b>	<b>138</b>	<b>2</b>	<b>1.4</b>

## 2) 産地別の陽性率

モニタリングした飼料原料の産地別の陽性率を Table 2 に示した。

国内製造品の陽性率は 1.5% であり，前々年度の 2.7%，前年度の 3.6% に比べて低い値であった。一方，6 検体あった輸入品は，前々年度，前年度と同様，すべて陰性であった。

国内製造品の種類別の陽性率は，魚粉が 1.5%（前々年度 4.2%，前年度 1.6%），原料混合肉

骨粉が 7.7% (前年度 25%) であった。一方、陽性率が前年度 10%であったフェザーミールは、すべて陰性であった。

**Table 2 Isolation of *Salmonella* from domestic and imported feed ingredients**

District or country	Number of samples positive for <i>Salmonella</i> / Number of samples examined									
	Animal protein feed			Oil seed meal			Brans and food processing by-product		Others	
	Fish meal	Poultry by-product meal	Others	Soybean meal	Rapeseed meal	Others	Wheat bran	Others	Total (Proportion positive)	
<b>Domestic product</b>										
Hokkaido	0/4	0/2	0/5						0/11 (0%)	
Tohoku	0/10	0/3	0/2						0/15 (0%)	
Kanto/Ko-Shin-Etsu	0/13		0/2		0/2	0/1		0/1	0/19 (0%)	
Tokai/Hokuriku	0/17	0/1	0/3			0/1		0/3	0/25 (0%)	
Kinki	0/4	0/1	0/1				0/1		0/7 (0%)	
Chugoku/Shikoku	1/6	0/7	0/4	0/1	0/1				1/19 (5.3%)	
Kyushu/Okinawa	0/10	0/11	1/13	0/2					1/36 (2.7%)	
Subtotal	1/64	0/25	1/30	0/3	0/3	0/2	0/1	0/4	2/132	
(Positive rate)	(1.5%)	(0%)	(3.3%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(1.5%)	
<b>Import</b>										
China				0/2				0/1	0/3 (0%)	
Chile	0/1								0/1 (0%)	
Denmark								0/1	0/1 (0%)	
U.S.A.								0/1	0/1 (0%)	
Subtotal	0/1			0/2				0/1	0/2	
(Positive rate)	(0%)			(0%)				(0%)	(0%)	
<b>Total</b>	<b>1/65</b>	<b>0/24</b>	<b>1/30</b>	<b>0/5</b>	<b>0/3</b>	<b>0/2</b>	<b>0/1</b>	<b>0/5</b>	<b>0/2</b>	<b>2/138</b>
(Positive rate)	(1.5%)	(0%)	(3.3%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(1.4%)

### 3) 出荷形態別の陽性率

モニタリングした飼料原料の出荷形態別の陽性率を Table 3 に示した。

飼料原料の出荷形態別の陽性率は、トランスバッグ等の大型輸送容器品が 2.9% (前々年度 4.6%, 前年度 5.3%) であった。また、陽性率が前々年度 0%, 前年度 4.2%の紙袋等の包装品及び前々年度 2.0%, 前年度 0%であったバラ積み等の無包装品は、すべて陰性であった。

## 3.2 配混合飼料の陽性率

### 1) 種類別の陽性率

モニタリングした配混合飼料の種類別の陽性率を Table 4 に示した。

配混合飼料は 138 検体すべてが陰性であった。なお、前々年度及び前年度の陽性率は各々 0.6% 及び 1.2%であった。

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

Feed ingredient	Packing form	Number of samples examined	Number of samples positive	Proportion positive (%)
<b>Animal protein feed</b>				
Fish meal	Bulk cargo <sup>a)</sup>	16	0	0
	Container bag <sup>b)</sup>	36	1	2.8
	Sealed bag <sup>c)</sup>	13	0	0
Poultry by-product meal	Bulk cargo	10	0	0
	Container bag	15	0	0
	Sealed bag	0	0	0
Others	Bulk cargo	9	0	0
	Container bag	18	1	5.6
	Sealed bag	3	0	0
Subtotal	Bulk cargo	35	0	0
	Container bag	69	2	2.9
	Sealed bag	16	0	0
<b>Oil seed meal</b>				
Soybean meal	Bulk cargo	4	0	0
	Container bag	0	0	0
	Sealed bag	1	0	0
Rapeseed meal	Bulk cargo	2	0	0
	Container bag	1	0	0
	Sealed bag	0	0	0
Others	Bulk cargo	1	0	0
	Container bag	0	0	0
	Sealed bag	1	0	0
Subtotal	Bulk cargo	7	0	0
	Container bag	1	0	0
	Sealed bag	2	0	0
<b>Bran and food processing by-product</b>				
Wheat bran	Bulk cargo	1	0	0
	Container bag	0	0	0
	Sealed bag	0	0	0
Others	Bulk cargo	2	0	0
	Container bag	0	0	0
	Sealed bag	3	0	0
Subtotal	Bulk cargo	3	0	0
	Container bag	0	0	0
	Sealed bag	3	0	0
<b>Others</b>				
Others	Bulk cargo	0	0	0
	Container bag	0	0	0
	Sealed bag	2	0	0
Total	Bulk cargo	45	0	0
	Container bag	70	2	2.9
	Sealed bag	23	0	0

a) Loading weight: 1,000 kgs~

b) Packing weight: 120~1,000 kgs

c) Packing weight: 3~25 kgs

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

Formula feed	Number of samples examined	Number of samples positive	Proportion positive (%)
Chicken and broiler	45	0	0
Swine	42	0	0
Cattle	50	0	0
Other Mixed feeds <sup>a)</sup>	1	0	0
Total	138	0	0

a) This feed was based defatted rice bran and contained alfalfa meal and some vitamins.

2) 配混合飼料の出荷形態別の陽性率

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

配混合飼料については、すべて陰性であった。なお、前々年度及び前年度の出荷形態別の陽性率は、トランスバック等の大型輸送容器品で各々0%及び1.7%、紙袋等の包装品で3.2%及び1.3%、バラ積み等の無包装品では両年度とも0%であった。

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

Formula feed	Packing form	Number of samples examined	Number of samples positive	Proportion positive (%)
Chicken and broiler	Bulk cargo <sup>a)</sup>	13	0	0
	Container bag <sup>b)</sup>	10	0	0
	Sealed bag <sup>c)</sup>	22	0	0
Swine	Bulk cargo	10	0	0
	Container bag	14	0	0
	Sealed bag	18	0	0
Cattle	Bulk cargo	2	0	0
	Container bag	22	0	0
	Sealed bag	26	0	0
Others	Bulk cargo	0	0	0
	Container bag	0	0	0
	Sealed bag	1	0	0
Total	Bulk cargo	25	0	0
	Container bag	46	0	0
	Sealed bag	67	0	0

a) Loading weight: 1,000 kgs~

b) Packing weight: 500~1,250 kgs

c) Packing weight: 10~20 kgs

3) 配混合飼料の加工形態別の陽性率

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

配混合飼料については、すべて陰性であった。なお、前々年度及び前年度の加工形態別の陽性率は、マッシュ等の非加熱加工飼料で0.7%及び1.6%で、ペレット等の加熱加工飼料では両年度とも0%であった。



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

Feed	Number of samples examined	Number of samples positive	Proportion positive (%)
Thermally processed <sup>a)</sup>	22	0	0
Not thermally processed <sup>b)</sup>	112	0	0

a) Feeds example: Pellet, Crumble, Pellet & flake

b) Feeds example: Mash, Bulky, Mash & flake

### 3.3 ギ酸製剤等添加飼料の陽性率

飼料の品質低下を防止する目的で、ギ酸製剤、プロピオン酸製剤あるいはギ酸・プロピオン酸製剤を添加する飼料原料及び配混合飼料がある。今年度、モニタリングした飼料の中には、これらを添加した飼料原料はなかったが、ギ酸製剤、プロピオン酸製剤あるいはギ酸・プロピオン酸製剤を添加した配混合飼料があった。これらの陽性率を Table 7 に示した。

配混合飼料 138 検体のうち、鶏用及び豚用 4 検体はギ酸製剤のみを 0.0011~0.064%添加し、牛用 1 検体は、プロピオン酸製剤のみを 0.08%、豚用 1 検体はギ酸製剤を 0.0021%、プロピオン酸製剤を 0.0033%添加していたが、前々年度、前年度と同様、すべて陰性であった。

**Table 7 Number and proportion of formic acid and propionic acid added feed samples  
*Salmonella*-positive**

Feed	Number of samples examined	Number of samples positive	Proportion positive (%)
Feed ingredient			
Added acids	0	0	0
Not added acids	138	2	1.4
Formula feed			
Added acids <sup>a)</sup>	6	0	0
Not added acids	132	0	0

a) Four samples had been added with formic acid with the density of 0.0011~0.064%; one sample with propionic acid with the density of 0.08%; and one sample with both formic acid and propionic acid with the density of 0.00218% and 0.0033% respectively.

### 3.4 陽性検体のサルモネラの血清型

サルモネラが陽性であった魚粉 1 検体及び原料混合肉骨粉 1 検体から分離した血清型を Table 8 に示した。

陽性検体から分離した血清型は 4 種類であった。このうち、原料混合肉骨粉 1 検体から 3 種類の血清型を分離したが、魚粉から分離した血清型は 1 種類のみであった。

*S. Senftenberg* 及び *S. Tennessee* は前々年度、前年度にも、また *S. Gaminara* は前年度にも飼料から分離されている。

なお、国立感染症研究所感染症情報センターの病原微生物検出情報 <sup>39)</sup>によれば、これら 4 血清型の内、*S. Menston* を除き、過去 5 年間に国内で発生したサルモネラ食中毒の原因菌として分離

された主要血清型リストに掲載されており、注意が必要であると考えられた。

**Table 8 Serotypes isolated in *Salmonella*-positive samples**

Serotype	Number of samples <i>Salmonella</i> -positive		
	Fish meal	Meat and bone meal (derived from pork and poultry)	Total
<i>S. Gaminara</i>		1	1
<i>S. Menston</i>		1	1
<i>S. Senftenberg</i>	1		1
<i>S. Tennessee</i>		1	1
Total	1	3	4

#### 4 まとめ

平成 19 年度の飼料のサルモネラ汚染状況は次のとおりであった。

- 1) 飼料原料は、138 検体中 2 検体が陽性であった（陽性率 1.4%）。
- 2) 飼料原料別の陽性率は、原料混合肉骨粉が 7.7%，魚粉が 1.5%であり、その他の飼料原料は、すべて陰性であった。
- 3) 飼料原料の産地別の陽性率は、国内製造品が 1.5%，輸入品が 0%であった。
- 4) 飼料原料の出荷形態別の陽性率は、無包装品が 0%，大型輸送容器品が 2.9%，包装品が 0%であった。
- 5) 配混合飼料は、138 検体すべてが陰性であった。
- 6) 陽性検体から 4 血清型のサルモネラを分離した。

#### 文 献

- 1) 吉村治郎：飼料研究報告，5，158 (1979).
- 2) Yoshimura, H., Nakamura, H., Sato, S.: National Institute of Animal Health Quarterly, 19, 107 (1979).
- 3) 菅野 清，安倍豊子，小山敬之：飼料研究報告，6，134 (1980).
- 4) 菅野 清，千原哲夫，草間豊子，小山敬之：飼料研究報告，7，161 (1981).
- 5) 菅野 清，千原哲夫，草間豊子，小山敬之：飼料研究報告，8，144 (1983).
- 6) 菅野 清，山谷昭一，千原哲夫，草間豊子，松原伊左夫：飼料研究報告，9，136 (1984).
- 7) 千原哲夫，松原伊左夫，山谷昭一，菅野 清，草間豊子：飼料研究報告，10，100 (1985).
- 8) 菅野 清，山谷昭一，千原哲夫，草間豊子，松原伊左夫，小山敬之，大宅辰夫，佐藤静夫：畜産の研究，39，29 (1985).
- 9) 千原哲夫，山谷昭一，松原伊左夫，浅木仁志，草間豊子，菅野 清，小山敬之：飼料研究報告，11，200 (1986).
- 10) 千原哲夫，鳶田秀一，草間豊子，浅木仁志，松原伊左夫，山谷昭一，菅野 清，小山敬之：飼料研究報告，12，222 (1987).
- 11) 木下光明，鳶田秀一，草間豊子，堀切正賀寿，小林利男，千原哲夫，小山敬之：飼料研究報告，13，131 (1988).

- 12) 木下光明, 鳶田秀一, 草間豊子, 堀切正賀寿, 小林利男, 千原哲夫, 小山敬之: 飼料研究報告, 13, 143 (1988).
- 13) 小林利男, 鳶田秀一, 草間豊子, 國分裕之, 堀切正賀寿, 小山敬之, 木下光明: 飼料研究報告, 14, 107 (1989).
- 14) 小林利男, 鳶田秀一, 草間豊子, 國分裕之, 堀切正賀寿, 小山敬之, 木下光明: 飼料研究報告, 14, 115 (1989).
- 15) 木下光明, 鳶田秀一, 菅野 清, 草間豊子, 堀切正賀寿, 小林利男, 松原伊左夫, 山谷昭一, 千原哲夫, 浅木仁志, 足立吉敷, 宮川栄一, 湊 一, 小山敬之: 畜産の研究, 43, 721 (1989).
- 16) 堀切正賀寿, 鳶田秀一, 小林利男, 福本裕二, 佐々木 隆, 小山敬之, 草間豊子: 飼料研究報告, 15, 81 (1990).
- 17) 福本裕二, 草間豊子, 小山敬之, 小林利男, 佐々木 隆, 白戸綾子, 堀切正賀寿: 飼料研究報告, 16, 201 (1991).
- 18) 國分裕之, 小山敬之, 菅野 清, 福本裕二, 金子昌二, 白戸綾子, 佐々木 隆, 堀切正賀寿: 飼料研究報告, 17, 125 (1992).
- 19) 伊佐まゆみ, 日比野 洋, 金子昌二, 國分裕之, 福本裕二, 菅野 清, 小山敬之: 飼料研究報告, 18, 102 (1993).
- 20) 平成5年度東京肥飼料検査所事業報告(飼料の部), 50 (1994).
- 21) 平成6年度東京肥飼料検査所事業報告(飼料の部), 58 (1995).
- 22) 平成7年度東京肥飼料検査所事業報告(飼料の部), 52 (1996).
- 23) 平成8年度東京肥飼料検査所事業報告(飼料の部), 51 (1997).
- 24) 原田治良, 佐々木 隆, 杉中 求, 草間豊子, 菅野 清, 尾室義典: 飼料研究報告, 23, 161 (1998).
- 25) 菅野 清, 風間鈴子, 佐々木 隆, 原田治良, 草間豊子: 飼料研究報告, 24, 109 (1999).
- 26) 千原哲夫, 荒木誠士, 工藤尚史, 内山 丈, 草間豊子, 佐々木 隆, 山内智憲, 末藤晴子, 野口 淳, 鬼頭敦司, 阿部文浩, 杉村 靖, 下村正之: 飼料研究報告, 25, 42 (2000).
- 27) 千原哲夫, 荒木誠士, 風間鈴子, 工藤尚史, 日比野 洋, 谷淵久之, 山内智憲, 末藤晴子, 坂上光一, 小森谷敏一, 阿部文浩, 山本克己, 下村正之, 舟津正人, 佐々木 隆, 草間豊子: 飼料研究報告, 26, 69 (2001).
- 28) 小嶋二三夫, 荒木誠士, 風間鈴子, 西村真由美, 内山 丈, 古川 明, 草間豊子, 谷淵久之, 日比野 洋, 末藤晴子, 橋本 亮, 小森谷敏一, 千原哲夫, 石田有希恵, 伊藤 潤, 青山恵介, 下村正之, 舟津正人: 飼料研究報告, 27, 155 (2002).
- 29) 小嶋二三夫, 風間鈴子, 西村真由美, 内山 丈, 古川 明, 草間豊子, 秋元京子, 日比野 洋, 末藤晴子, 野村哲也, 小森谷敏一, 小宮友紀子, 千原哲夫, 青山恵介, 井上智江, 下村正之, 鬼頭敦司, 松崎 学, 牧野大作, 松崎美由起: 飼料研究報告, 28, 110 (2003).
- 30) 小嶋二三夫, 関口好浩, 山本克己, 西村真由美, 石田有希恵, 内山 丈, 古川 明, 草間豊子, 秋元京子, 日比野 洋, 山多晴子, 野村哲也, 杉本泰俊, 橋本仁康, 小森谷敏一, 三井友紀子, 千原哲夫, 中村志野, 井上智江, 吉田知太郎, 鬼頭敦司, 松崎 学, 屋方光則, 牧野大作, 林 美紀子, 松崎美由起: 飼料研究報告, 29, 228 (2004).

- 31) 小嶋二三夫, 遠藤 剛, 山本克己, 西村真由美, 高橋亜紀子, 白澤優子, 古川 明, 福中理絵, 草間豊子, 本 広昭, 野村哲也, 杉本泰俊, 橋本仁康, 下村正之, 小森谷敏一, 三井友紀子, 内山 丈, 牧野大作, 青山恵介, 吉田知太郎, 鬼頭敦司, 荒木誠士, 屋方光則, 林 美紀子, 永原貴子, 松崎美由起, 児玉恭子: 飼料研究報告, **30**, 129 (2005).
- 32) 千原哲夫, 関口好浩, 本 広昭, 杉本泰俊, 大島慎司, 遠藤 剛, 高橋亜紀子, 松崎美由起, 白澤優子, 山本克己, 森 有希子, 下村正之, 小森谷敏一, 辻 由里子, 内山 丈, 牧野大作, 林 美紀子, 吉田知太郎, 山田美帆, 鬼頭敦司, 屋方光則, 青山恵介, 井上智江, 永原貴子, 野村昌代, 児玉恭子: 飼料研究報告, **31**, 218 (2006).
- 33) 千原哲夫: 飼料研究報告, **32**, 193(2007).
- 34) 農林水産省畜産局流通飼料課長通知: “飼料製造に係るサルモネラ対策のガイドラインについて”, 平成 10 年 6 月 30 日, 10-12 (1998).
- 35) 米田勝紀: 獣医畜産新報, **54**, 568 (2001).
- 36) 小嶋二三夫, 千原哲夫, 菅野 清, 佐藤 剛: 飼料研究報告, **29**, 236 (2004).
- 37) 農林水産省畜産局長通知: “飼料分析基準の制定について”, 平成 7 年 11 月 15 日, 7 畜 B 第 1660 号 (1995).  
現行 農林水産省消費・安全局長通知: “飼料分析基準の制定について”, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).
- 38) 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).
- 39) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, <http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html>.

**調査資料****2 牛海綿状脳症の発生防止対策における飼料の動物由来たん白質等のモニタリング結果（平成18年度）**

草間 豊子\*

**A Monitoring of Animal Protein Contamination in Feeds  
as a Measure to Prevent BSE in Japan (2006)**

Toyoko KUSAMA\*

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

To prevent the establishment and amplification of bovine spongiform encephalopathy (BSE) through animal feed in Japan, the use of mammalian protein for food-producing animals and the use of animal protein for production of feed for ruminants have been prohibited since October 2001. The Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) is engaged in the analysis of feed samples for presence of animal protein as an audit inspection agency of this feed ban. In fiscal year 2006, the FAMIC analyzed 185 samples of domestic feeds for cattle, 44 samples of imported feeds for cattle and 199 samples of animal by-products for contamination of ruminant protein, using three methods: microscopy, which detects animal origin bone tissue; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), which detects animal origin protein; and polymerase chain reaction (PCR), which detects animal origin DNA. None of domestic and imported feed samples for cattle was contaminated with prohibited animal protein. None of 31 samples of chicken meal, 23 samples of feather meal or 107 samples of fish meal was contaminated with mammalian protein. One (3.7%) of 27 samples of meat-and-bone meal of pork-origin and pork-and-chicken-origin was positive for ruminant protein. After cleaning of the manufacturing plant was conducted, feed products were sampled and analyzed with negative results. Two commercially available ELISA kits: Morinaga ELISA kit against a heat-treated bovine protein (Morinaga Institute of Biological Science, Inc.); and MELISA-TEK RUMINAT KIT for meat-and-bone meal and animal feed (ELISA Technologies, Inc.) were tested using 32 samples of chicken meal and feather meal. MELISA-TEK produced better results.

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

---

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

## 1 緒 言

牛海綿状脳症（BSE）の発生防止のため、独立行政法人農林水産消費安全技術センターでは以前から顕微鏡鑑定による配合飼料中の肉骨粉混入検査を実施してきたが、平成13年9月に国内で牛海綿状脳症が発生したのを契機として、試験研究機関の協力の下、顕微鏡鑑定法<sup>1)</sup>を補完する手法としてPCR法<sup>11)~16)</sup>及びELISA法<sup>17)~20)</sup>による肉骨粉の高感度検出及び動物種の識別法の開発に取り組み、飼料分析法<sup>2)~4)</sup>として確立し、漸次、国内の飼料のモニタリング検査に適用してきた。

平成13年度にこれらの分析手法による魚粉中の牛・豚由来たん白質等のモニタリングを開始し、平成14年度以降は、国内の動物質性飼料及び牛用配混合飼料について、本格的な動物由来たん白質のモニタリングを実施し、その結果を報告<sup>6)~10)</sup>してきた。

平成18年度は、飼料製造工程において牛用飼料に鶏豚用飼料原料の動物由来たん白質が混入するいわゆる交差汚染の防止及び、飼料規制の実効性を確認するため、牛用配混合飼料のモニタリング検査を重点的に実施した。また、飼料原料として、動物由来たん白質等が含まれないことについて農林水産大臣確認の必要な動物質性飼料のチキンミール、フェザーミール、魚粉、豚肉骨粉及び鶏豚原料混合肉骨粉等について、引き続き大臣確認に伴うモニタリング検査を行った。さらに、輸入飼料の監視強化に伴い、輸入の牛用の混合飼料や飼料原料についてもモニタリング検査を実施した。

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

今回、平成18年度に実施した飼料中の動物由来たん白質等のモニタリング結果をとりまとめたので、その概要を報告する。

## 2 材料及び方法

### 2.1 試 料

平成18年4月から平成19年3月までに、独立行政法人農林水産消費安全技術センター（当時独立行政法人肥飼料検査所）本部（さいたま市）、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター大阪事務所及び同福岡センターが、国内の飼料原料工場、配混合飼料工場及び港湾倉庫等で採取した動物質性飼料199検体、国内製造牛用配混合飼料185検体及び輸入牛用飼料44検体の計428検体をモニタリング対象とした。

動物質性飼料としては、国内で製造されたチキンミール及びフェザーミール（以下「チキンミール等」という。）、豚由来肉骨粉及び原料混合肉骨粉（以下「豚肉骨粉等」という。）並びに魚粉や魚荒かす等（以下「魚粉等」という。）を主に収集したが、その他にこれらを主体とした養魚用混合飼料やフィッシュソリュブル吸着飼料についても収集し、調査を実施した。

牛用配混合飼料としては、育成用、成牛用を問わず幅広く収集した。なお、脱脂粉乳や乾燥ホエー等の乳製品を10%以上含む代用乳等は、対象から除外した。

輸入飼料は、牛用配混合飼料及び牛用（A飼料）単体飼料（加熱加工等処理を行った包装品）を採取した。

試料の採取は、飼料等検査実施要領<sup>5)</sup>の病原微生物検査用試料の採取方法に従い、滅菌済み手袋及び滅菌済みスコップを使用し、滅菌済み採取袋に約500gを採取した。試料は試験までの間、

冷蔵保管した。

## 2.2 試験実施場所

試験は、それぞれの試料を収集したセンターの試験室において実施した。

## 2.3 方法

試験は、以下に示す3法により行った。

### 1) 顕微鏡鑑定

「反すう動物用飼料への反すう動物由来たん白質の混入防止に関するガイドライン」<sup>1)</sup>に従い、図1の方法で獣骨・獣毛・羽毛等（以下「肉骨粉等」という。）の有無を鑑定した。

なお、検出した場合には、牛用配合飼料に肉骨粉を0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5及び1%添加した鑑定用対照試料を試料と同時に処理し、肉骨粉等の混入量を推定した。

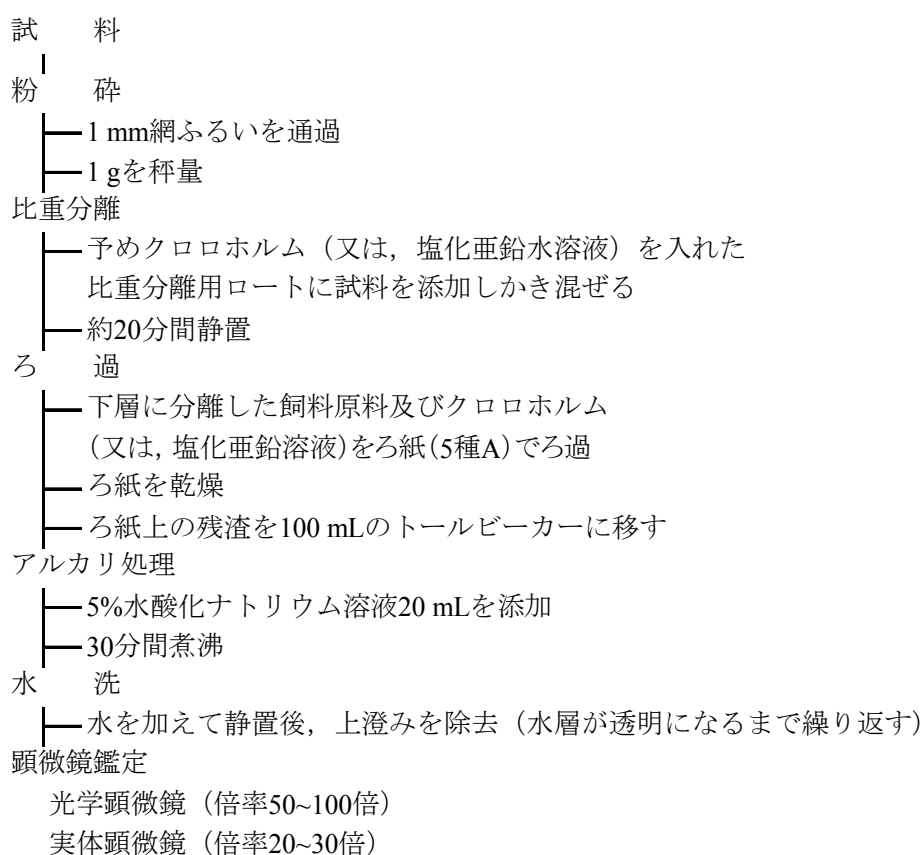


図1 飼料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

### 2) ELISA 試験

「ELISAによる飼料中の動物由来たん白質の検出法」<sup>2)~4)</sup>に基づき、牛用配混合飼料、魚粉等及びチキンミール等中の牛由来たん白質については「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」（森永生科学研究所製、以下「モリナガキット」という。）を用い、豚肉骨粉等中の反すう動物由来たん白質については、「MELISA-TEK 高度加工肉検出キット 反すう動物用」（ELISA Technologies製、以下「メライザキット」という。）を用いて試験を実施した。また、チキンミール等へのメライザキットの適用の可否について調査を行った。なお、平成18年度は、ELISAによる鶏由来たん白質及び豚由来たん白質の試験は実施しなかった。

試験は1検体あたり2点併行で実施し、2点の結果が一致しない場合には、再試験を実施し、再試験の結果が一致しない場合には、陰性と判定した。

試験の概要は以下のとおり。

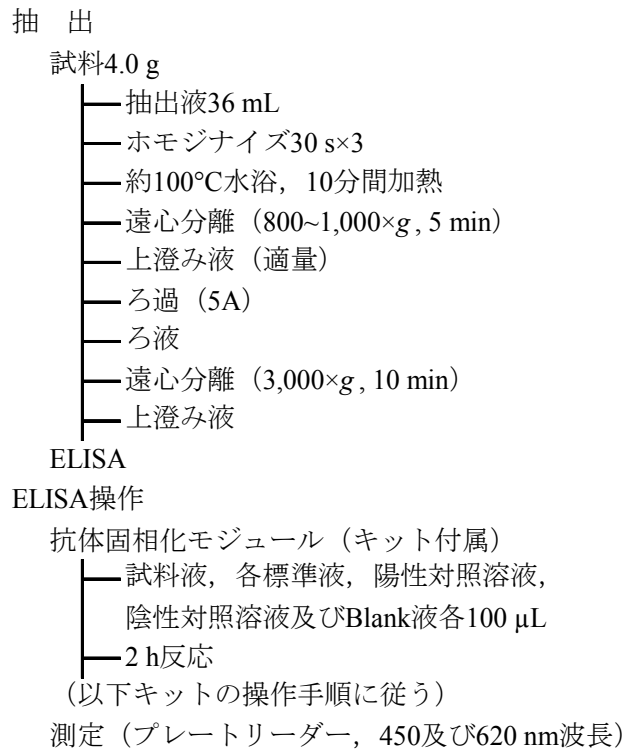


図 2-1 「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」による試験方法

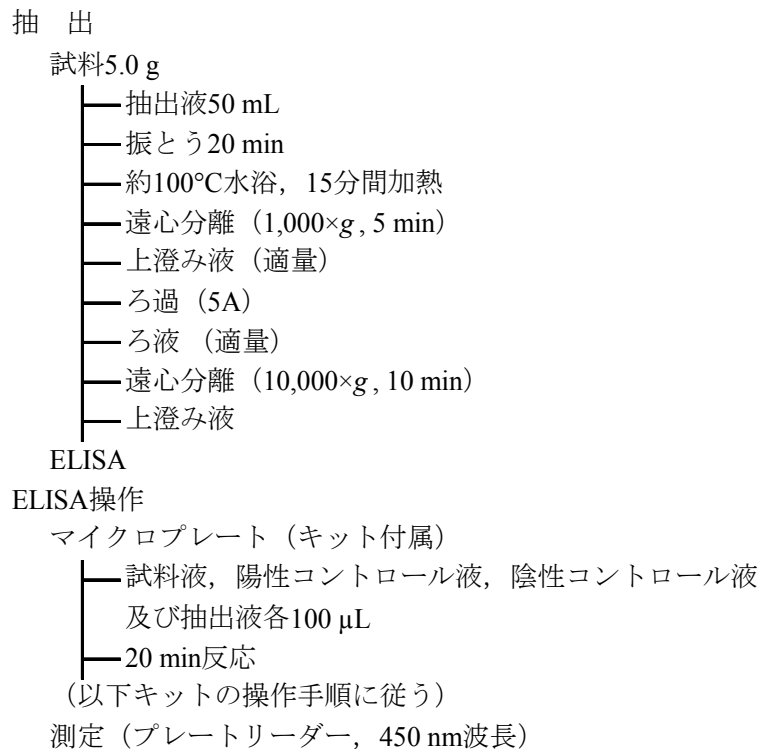


図 2-2 「MELISA-TEK 高度加工肉検出キット 反すう動物用」による試験方法



### 3) PCR 試験

「PCRによる飼料中の動物由来DNAの検出法」<sup>2)-4)</sup>に基づき、豚肉骨粉等以外の飼料ではほ乳動物由来DNAの検出を行い、ほ乳動物由来DNAが検出された場合には、牛由来DNA及び豚由来DNAの検出を行った。豚肉骨粉等の試験では、反すう動物由来DNAの検出を行い、反すう動物由来DNAが検出された場合には、牛由来DNAの検出を行った。乳製品又はゼラチンの添加又は混入の可能性のある牛用配混合飼料、輸入飼料、豚肉骨粉等及び魚粉等については、乳製品を含む飼料中の肉骨粉の検出法（以下「乳製品等除去処理」という。）<sup>2), 4), 15), 16)</sup>を行った。

なお、同時にDNAの抽出確認のためのコントロールとして、牛用配合飼料については植物由来DNAの検出を、魚粉等については魚類由来DNAの検出<sup>12)</sup>を、チキンミール等及び鶏豚検量混合肉骨粉については家きん由来DNAの検出<sup>13)</sup>を、豚肉骨粉についてはほ乳動物又は豚由来DNAの検出等を行い、コントロールDNAが検出されない場合には、DNAの再抽出を行った。

プライマーは、ほ乳動物検出プライマー対 [anicon 3, anicon 5]（テキサスジェノミクスジャパン製、以下同じ。）、反すう動物検出プライマー対 [rumicon32, rumicon52]、牛検出プライマー対 [cow 31, cow 52]、豚検出プライマー対 [pig 32-2, pig 5-3]、家きん（鶏・うずら）検出プライマー対 [chick3-1, chick5-1]、植物検出プライマー対 [placon 3, placon 5] 及び魚類検出プライマー対 [FM3, FM5] を用いた。

なお、試験は1検体当たり2点併行で実施し、2点ともに陽性の場合に検出と判定し、2点の結果が一致しない場合及び2点とも陰性の場合には、不検出と判定した。

試験の概要は、図3に示した。

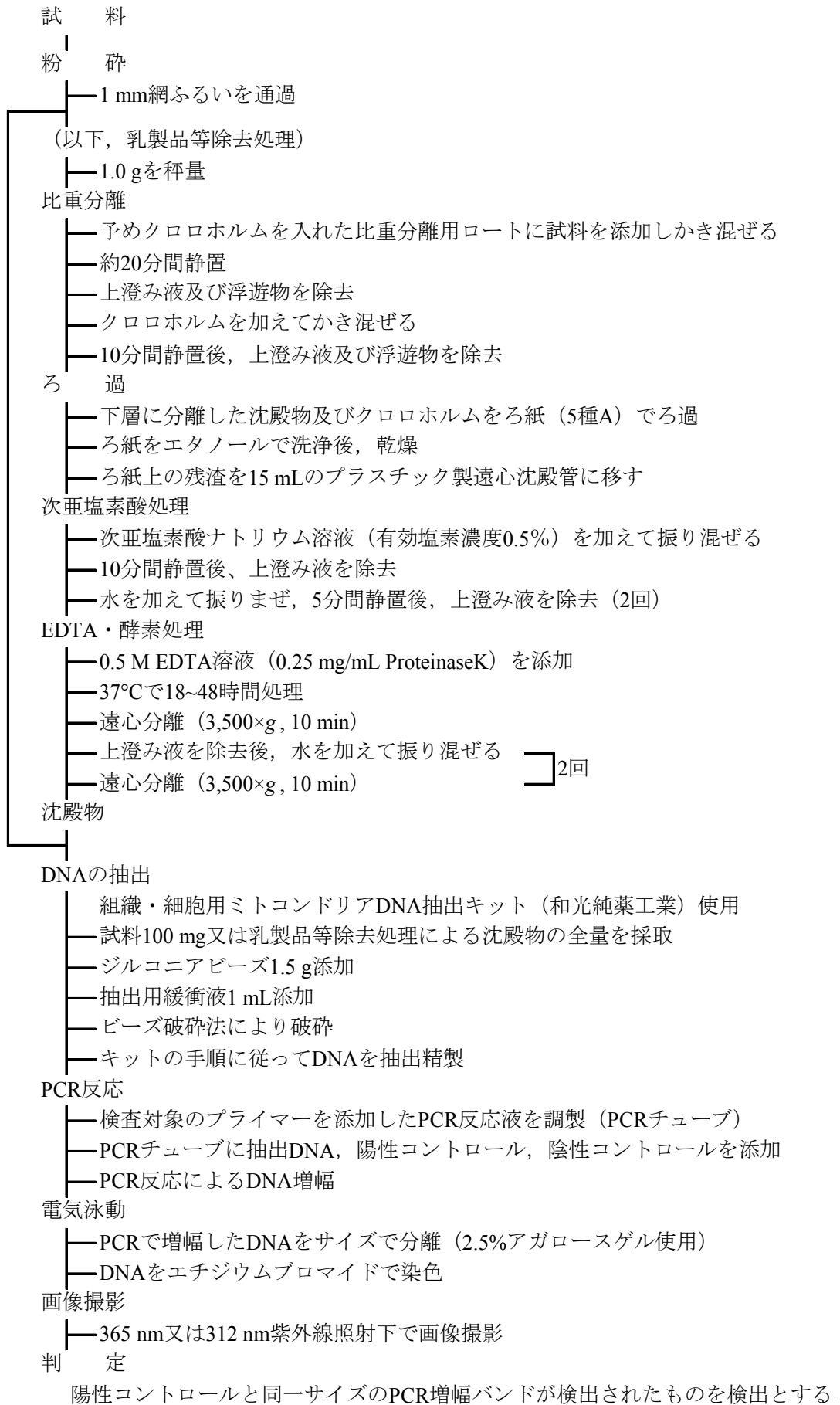


図3 PCR法による動物由来DNAの検出方法

#### 4) 動物由来たん白質等の判定方法

顕微鏡鑑定、ELISA 及び PCR 試験の結果から、以下の手順で動物由来たん白質の有無を判定した。

豚肉骨粉等を除く試料について顕微鏡鑑定を実施し、獣骨・獣毛等が検出された場合には「肉骨粉検出」と判定した。

顕微鏡鑑定の結果にかかわらず、全試料について ELISA 及び PCR 試験を実施し、試験結果が同一の動物種について一致して陽性であった場合に、動物由来たん白質・DNA（以下「動物由来たん白質等」という。）検出と判定した。

なお、モリナガキットを用いた ELISA 試験では、反すう動物用飼料への使用が認められている乳製品の添加により牛由来たん白質が検出される場合があることから、乳製品の混入の可能性のある飼料については、乳製品等除去処理 PCR 試験を実施し、PCR 試験の結果陽性であった場合にのみ検出と判定した。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 動物質性飼料のモニタリング

動物質性飼料 199 検体について、ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングを行った。199 検体の試料の内訳は、チキンミール等 54 検体、魚粉等 107 検体、豚肉骨粉等 27 検体、その他動物性たん白質を含む飼料 11 検体であった。

これらのモニタリング集計結果は、表 1 に示したとおりであり、動物質性飼料 199 検体のうち、ほ乳動物由来たん白質等が検出されたものはなかった。

平成 17 年度は、家きん由来たん白質等のモニタリングも同時に実施したが、平成 18 年度からは、BSE 発生リスクの高い反すう動物由来たん白質について重点的にモニタリングを行うこととした。

表1 動物質性飼料のモニタリング結果 (平成18年度)

動物質性 飼料の区分	飼料の種類	試験 検体数	ほ乳動物由来たん白質等	
			検出数	検出率 (%)
チキンミール等	チキンミール	31	0	0.0
	フェザーミール	23	0	0.0
	小計	54	0	0.0
魚粉等 (内訳)	国内製造魚粉等	107	0	0.0
	魚粉・魚アラ粕	(92)		
	だし粕	(4)		
	イカミール	(3)		
	カニ殻	(2)		
	魚鱗コラーゲン	(1)		
	貝ミール	(1)		
	酵素処理魚抽出物	(3)		
	フィッシュソリュブル	(1)		
	小計	107	0	0.0
豚肉骨粉等	豚肉骨粉	4	0	0.0
	鶏豚原料混合肉骨粉	23	1	4.3
	小計	27	1	0.0
その他	魚介類由来原料を主体とした混合飼料	5	0	0.0
	魚粉・大豆油かす2種混合飼料	1	0	0.0
	フィッシュソリュブル吸着飼料	1	0	0.0
	加水分解たん白質 (ペットフード用)	3	0	0.0
	フェザーミール・大豆油かす2種混合飼料	1	0	0.0
	小計	11	0	0.0
合計		199	1	0.5

## 1) チキンミール等

チキンミール 31 検体及びフェザーミール 23 検体の計 54 検体について、ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングを行った。平成 18 年度は、血粉及び発酵血粉の採取はなかった。

試験は、すべての検体について、顕微鏡鑑定、ELISA 及び PCR 試験を実施した。

試験の結果は、表 2-1 に示したように、顕微鏡鑑定で獣骨・獣毛が検出されたものはなかった。モリナガキットによる ELISA 試験では、牛由来たん白質が 9 検体 (フェザーミール 7 検体、チキンミール 2 検体) で陽性であり、陽性率は 16.7%であった。

ELISA 陽性の検体を含むすべての試料について、PCR によりほ乳動物由来 DNA の試験を行った結果は、いずれもほ乳動物由来 DNA が検出されなかった。したがって、総合判定ではすべてほ乳動物由来たん白質等不検出と判定された。

モリナガキットによる ELISA 試験において多数の陽性が確認されたことから、この原因について調べるため、平成 18 年 8 月までに採取したチキンミール 17 検体及びフェザーミール 15 検体の計 32 検体について、メライザキットを用いて ELISA 試験を実施し、モリナガキットの結果と比較した。

試験の結果は、表 2-2 及び 2-3 に示したように、モリナガキット陽性の 9 検体を含むすべての

試料でメライザキットでは、反すう動物由来たん白質を検出しなかった。メライザキットは、反すう動物由来の肉骨粉など骨格筋を特異的に検出し、他の動植物由来たん白質や乳等組織には反応しない<sup>20)</sup>ことから、平成18年度のモリナガキット陽性検体には、牛肉骨粉の混入はないものと判断された。

これらの結果から、チキンミール等のELISA試験には、モリナガキットよりメライザキットを適用することがよいと考えられたことから、平成19年度以降のモニタリングにおいては、メライザキットを用いることとした。

表 2-1 チキンミール等の試験結果（平成18年度）

試験方法	検出対象	試験検体数	陽性数	陽性率 (%)
顕微鏡鑑定	獣骨・獣毛	54	0	0.0
ELISA試験	牛由来たん白質 <sup>注1)</sup>	54	9	16.7
	反すう動物由来たん白質 <sup>注2)</sup>	54	0	0.0
PCR試験	ほ乳動物由来DNA	54	0	0.0
	牛由来DNA	54	0	0.0
		試験検体数	検出数	検出率 (%)
総合判定 (内訳)	ほ乳動物由来たん白質・DNA	54	0	0.0
	牛由来たん白質・DNA	54	0	0.0

注 1) モリナガキットによる

2) メライザキットによる

表 2-2 メライザキットとモリナガキットの比較（チキンミール）

(n=2)

チキンミール 試料No.	メライザキット (Blank補正済み)		モリナガキット		顕微鏡鑑定 獣骨・獣毛	PCR試験 ほ乳動物由来 DNA		
	判定 <sup>注1)</sup>	Sample (O.D.)	NC (O.D.)	判定 <sup>注2)</sup>			Sample (O.D.)	NC (O.D.)
C1	-	-0.005	0.002	-	0.082	0.049	-	-
C2	-	-0.001	0.014	-	0.058	0.066	-	-
C3	-	-0.001	0.014	-	0.044	0.033	-	-
C4	-	-0.016	-0.001	-	0.045	0.033	-	-
C5	-	-0.013	-0.001	+	0.185	0.041	-	-
C6	-	-0.013	0.006	-	0.059	0.050	-	-
C7	-	-0.010	0.006	-	0.105	0.073	-	-
C8	-	-0.008	0.006	-	0.119	0.073	-	-
C9	-	0.036	0.006	-	0.075	0.043	-	-
C10	-	-0.004	0.006	-	0.048	0.043	-	-
C11	-	0.002	0.002	-	0.091	0.050	-	-
C12	-	-0.010	0.002	-	0.050	0.041	-	-
C13	-	-0.015	0.002	-	0.063	0.041	-	-
C14	-	0.026	0.002	+	0.138	0.050	-	-
C15	-	-0.007	0.002	-	0.067	0.052	-	-
C16	-	0.000	0.002	-	0.063	0.041	-	-
C17	-	0.003	0.013	-	0.030	0.034	-	-
陽性/試料	0/17			2/17			0/17	0/17

注 1) Sample (O.D.)が 0.100 以上の場合に+と判定

2) Sample (O.D.)が, NC (O.D.)の 2 倍以上であった場合に+と判定

表 2-3 メライザキットとモリナガキットの比較 (フェザーミール) (n=2)

フェザーミール 試料No.	メライザキット (Blank補正済み)		モリナガキット		顕微鏡鑑定 獣骨・獣毛	PCR試験 ほ乳動物由来 DNA		
	判定 <sup>注1)</sup>	Sample (O.D.)	NC (O.D.)	判定 <sup>注2)</sup>			Sample (O.D.)	NC (O.D.)
F1	-	-0.004	0.002	+	0.093	0.032	-	-
F2	-	-0.016	-0.001	-	0.050	0.033	-	-
F3	-	-0.012	-0.001	-	0.062	0.033	-	-
F4	-	-0.009	-0.001	+	0.068	0.033	-	-
F5	-	-0.007	0.004	-	0.062	0.040	-	-
F6	-	-0.013	0.004	+	0.210	0.073	-	-
F7	-	-0.003	0.004	+	0.153	0.073	-	-
F8	-	-0.005	0.004	+	0.158	0.073	-	-
F9	-	-0.004	0.004	-	0.137	0.073	-	-
F10	-	-0.010	0.002	+	0.111	0.050	-	-
F11	-	-0.004	0.002	+	0.096	0.041	-	-
F12	-	-0.001	0.002	-	0.056	0.041	-	-
F13	-	0.004	0.013	-	0.053	0.034	-	-
F14	-	0.021	0.013	-	0.064	0.038	-	-
F15	-	0.002	0.005	-	0.056	0.037	-	-
陽性/試料	0/15			7/15			0/15	0/15

注 1) Sample (O.D.)が 0.100 以上の場合に+と判定

2) Sample (O.D.)が, NC (O.D.)の 2 倍以上であった場合に+と判定

## 2) 魚粉等

国内で製造した魚介類由来たん白質を含む魚粉等 107 検体について、ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングを行った。魚粉等の内訳は、表 1 のとおり、魚粉・魚アラ粕 92 検体、だし粕 4 検体、イカミール 3 検体、カニ殻 2 検体、魚鱗コラーゲン 1 検体、貝ミール 1 検体、酵素処理魚抽出物 1 検体及びフィッシュソリュブル 1 検体であった。

輸入魚粉については、平成 15 年度以降、農林水産省動物検疫所による輸入時の検査との重複を避けるため、製造事業所での採取を原則として取りやめたことから、平成 18 年度は採取しなかった。

ほ乳動物由来たん白質等の試験の結果は、表 3 に示したように、顕微鏡鑑定で獣骨・獣毛が検出されたものはなかった。ELISA 試験では牛由来たん白質が 1 検体で陽性であったが、PCR 試験ではほ乳動物由来 DNA が検出されたものはなく、総合判定では、すべてほ乳動物由来たん白質等を不検出と判定された。

なお、平成 17 年度のモニタリングにおいて、ELISA 及び PCR 試験で多数の魚粉等からほ乳動物由来たん白質等が検出された<sup>10)</sup>ことから、この原因を確認するため、水産練り製品等について ELISA 及び PCR 試験による調査を実施した。調査の結果は、魚肉ソーセージ、チーズ入り蒲鉾及びみりん干しからはほ乳動物由来たん白質・DNA が検出され、ちくわ、魚肉すり身及びさつま揚げからは検出されなかった。また、乳製品等除去処理 PCR ではいずれもほ乳動物由来 DNA が検出されなかった。したがって、魚粉等の陽性事例は、乳製品やゼラチンを添加した水産練り製品等の混入の可能性が示唆された。魚粉への食品残渣の利用は認められていないが、水産加工残渣の飼料への有効利用を推進するため、乳製品等の混入事例について、違反処理す

ることのないよう、平成18年度は、魚粉等の検査にあたり、PCR陽性検体について乳製品等除去処理PCRによる確認試験を実施することとした。

表3 魚粉等の試験結果（平成18年度）

試験方法	検出対象	試験検体数	陽性数	陽性率 (%)
顕微鏡鑑定	獣骨・獣毛	107	0	0.0
ELISA試験	牛由来たん白質 <sup>注1)</sup>	107	1	0.9
PCR試験	ほ乳動物由来DNA	107	0	0.0
	牛由来DNA	107	0	0.0
		試験検体数	検出数	検出率 (%)
総合判定 (内訳)	ほ乳動物由来たん白質・DNA	107	0	0.0
	牛由来たん白質・DNA	107	0	0.0

注1) モリナガキットによる

### 3) 豚肉骨粉等

平成17年4月に豚肉骨粉及び鶏豚原料混合肉骨粉の鶏豚用飼料への使用が認められたことから、平成17年度以降、豚肉骨粉等のモニタリングを実施<sup>10)</sup>している。

平成18年度は、表1に示したように豚肉骨粉4検体及び鶏豚原料混合肉骨粉23検体の計27検体について、反すう動物由来たん白質等のモニタリングを行った。

顕微鏡鑑定により豚肉骨粉中の牛由来組織を検出することは困難であるため、豚肉骨粉等の試験は、ELISA及びPCR試験により実施した。

また、ELISA試験は、当初「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」により実施したところ、多数の豚肉骨粉検体で陽性反応が見られた。この原因として、子豚に給与した代用乳等の乳製品等が豚肉骨粉中に混入したためと考えられたことから、豚肉骨粉等のELISA試験には、乳製品の影響を受けないELISAキット「MELISA-TEK 高度加工肉検出キット反すう動物用」を導入し、試験を実施した。PCR試験は、乳製品等除去処理法を実施した。

試験の結果は、表4に示したように、原料混合肉骨粉1検体でELISA及びPCR試験で反すう動物由来たん白質及び反すう動物由来DNAを検出し、総合判定で反すう動物由来たん白質等検出と判定された。この検体は、事業場の農林水産大臣確認前の調査試料であり、反すう動物由来たん白質等が検出されたことから、工程の洗浄クリーニングを実施した後に、再度試料を採取して確認した結果は、反すう動物由来たん白質は検出されなかった。

表 4 豚肉骨粉等の試験結果 (平成 18 年度)

試験方法	検出対象	試験検体数	陽性数	陽性率 (%)
顕微鏡鑑定	獣骨・獣毛	NT		
ELISA試験	反すう動物由来たん白質 <sup>注1)</sup>	27	1	3.7
PCR試験	反すう動物由来DNA	27	1	3.7
	牛由来DNA	27	1	3.7
		試験検体数	検出数	検出率 (%)
総合判定	反すう動物由来たん白質・DNA	27	1	3.7
(内訳)	牛由来たん白質・DNA	8	0	0.0

注 1) メライザキットによる

#### 4) その他の動物質性飼料

1)~3)以外に、魚介類由来たん白質等の動物性飼料を含むかあるいは含む可能性のある飼料 11 検体について、ほ乳動物あるいは反すう動物由来たん白質等の試験を行った。これらの内訳は、魚粉を主体とした混合飼料 5 検体、フィッシュソリュブル吸着飼料 1 検体、魚粉大豆油かす 2 種混合飼料 1 検体、フェザーミール大豆油かす 2 種混合飼料 1 検体及び加水分解たん白質 (豚及び鶏由来) 3 検体であった。

試験の結果は、表 1 に示したように、顕微鏡鑑定で肉骨粉等が検出されたものはなかった。また、ELISA 試験及び PCR 試験ではほ乳動物由来たん白質等が検出されたものはなかった。

なお、一部の発酵飼料において、コントロール試験の魚類由来 DNA が検出されなかったが、製造過程において魚類由来 DNA が分解されたものと考えられた。

### 3.2 国内製造牛用配混合飼料のモニタリング

平成 18 年度は、185 検体の国内製造牛用配混合飼料について、ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングを実施した。平成 18 年度は、家きん由来たん白質等のモニタリングは実施しなかった。

飼料の種類の内訳は、表 5 に示したように、ほ乳期子牛育成用配合飼料 6 検体、幼令牛育成用配合飼料 16 検体、若令牛育成用配合飼料 14 検体、肉用牛肥育用配合飼料 65 検体、乳用牛飼育用配合飼料 51 検体、繁殖用・種牛用配合飼料 12 検体及び牛用混合飼料 21 検体であった。

モニタリングの結果、ほ乳動物由来たん白質等を検出したものはなかった。

表 5 牛用配混合飼料のモニタリング結果 (平成 18 年度)

飼料の種類	試験検体数	ほ乳動物由来たん白質等	
		検出数	検出率 (%)
牛用配混合飼料			
ほ乳期子牛育成用	6	0	0.0
幼令牛育成用	16	0	0.0
若令牛育成用	14	0	0.0
肉用牛肥育用	65	0	0.0
乳用牛飼育用	51	0	0.0
繁殖用・種牛用	12	0	0.0
混合飼料	21	0	0.0
合計	185	0	0.0



ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングでは、全検体について顕微鏡鑑定（獣骨，獣毛），ELISA 及び PCR 試験を実施した。

「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」による ELISA 試験及び通常の PCR 試験では、法令上牛用配合飼料への使用が認められている乳製品によって陽性反応が生ずる可能性があることから、平成 17 年度から、PCR 試験について乳製品を含む飼料中の肉骨粉の検出法（乳製品等除去処理）<sup>2), 4), 15), 16)</sup>を導入した。乳製品が添加されている検体及び通常の PCR 試験では乳動物由来 DNA が検出された検体については、乳製品等除去処理による確認検査を実施した。

試験の結果は、表 6 に示したように、185 検体中顕微鏡鑑定で獣骨・獣毛が検出されたものはなかった。ELISA 試験では、185 検体のうち 12 検体で牛由来たん白質が陽性であった。

PCR 試験では、185 検体中 2 検体では乳動物由来 DNA が検出されたが、牛由来 DNA 又は豚由来 DNA が検出されたものはなかった。このうち乳製品が添加された配合飼料は 5 検体であり、乳製品除去処理を実施したものは 19 検体であった。

185 検体のうち PCR 及び ELISA 試験で一致して陽性の検体はなく、総合判定により肉骨粉等の違反となるほ乳動物由来たん白質等を検出したものはなかった。

表 6 牛用配混合飼料のほ乳動物由来たん白質等の試験結果（平成 18 年度）

試験方法	検出対象	試験検体数	陽性数	陽性率 (%)
顕微鏡鑑定	獣骨・獣毛	185	0	0.0
ELISA 試験	牛由来たん白質 <sup>注1)</sup>	185	12	6.5
PCR 試験	ほ乳動物由来 DNA	185	2	1.1
	牛由来 DNA	185	0	0.0
	豚由来 DNA	185	0	0.0
		試験検体数	検出数	検出率 (%)
総合判定	反すう動物由来たん白質・DNA	185	0	0.0

注 1) モリナガキットによる

### 3.3 輸入飼料のモニタリング

輸入飼料については、平成 17 年度から重点検査を開始し、平成 18 年度は輸入の牛用混合飼料及び植物性単体飼料についてモニタリングを実施した。

試料は、表 7 に示したように、牛用配混合飼料 36 検体、牛用飼料添加物 2 検体及び植物性単体飼料 6 検体の併せて 44 検体であった。

輸入飼料の輸入先国は、表 8 に示したように、アメリカ合衆国が 23 検体と最も多く、ついで中華人民共和国が 5 検体、カナダ及び英国が各 3 検体、台湾及びタイが各 2 検体、大韓民国、フランス、シンガポール、アイルランド、スイス及びオーストラリアが各 1 検体であった。

試験の結果は、表 9 に示したように、顕微鏡鑑定で獣骨・獣毛等が検出されたものはなかった。ELISA 試験では、牛由来たん白質が 4 検体で陽性であり、PCR 試験では、乳製品等除去処理による確認試験においてほ乳動物由来 DNA が検出されたものが 2 検体あったが、総合判定ではすべてほ乳動物由来たん白質等が不検出と判断された。

表 7 輸入飼料のモニタリング結果 (平成 18 年度)

輸入飼料の区分	飼料の種類等	試験検体数	ほ乳動物由来たん白質等	
			検出数	検出率 (%)
配混合飼料	牛等用混合飼料	36	0	0.0
飼料添加物	牛用飼料添加物	2	0	0.0
植物性単体飼料	甘草抽出物	1	0	0.0
	コーンコブミール	1	0	0.0
	雑穀酒かす	1	0	0.0
	大豆油かす	1	0	0.0
	バガス	1	0	0.0
	ビール粕	1	0	0.0
	小計	6	0	0.0
合計		44	0	0.0

表 8 輸入飼料の輸入先国 (平成 18 年度)

輸入先国	試験検体数			
	合計	牛用混合飼料	飼料添加物	植物性単体飼料
アメリカ合衆国	23	20	2	1
中華人民共和国	5	2		3
英国	3	3		
カナダ	3	3		
台湾	2	2		
タイ	2	0		2
大韓民国	1	1		
フランス	1	1		
シンガポール	1	1		
アイルランド	1	1		
スイス	1	1		
オーストラリア	1	1		
合計	44	36	2	6

表 9 輸入飼料のモニタリング結果 (平成 18 年度)

試験方法	検出対象	試験検体数	陽性数	陽性率 (%)
顕微鏡鑑定	獣骨・獣毛	44	0	0.0
ELISA試験	牛由来たん白質 <sup>注1)</sup>	44	12	27.3
PCR試験	ほ乳動物由来DNA	44	2	4.5
	牛由来DNA	44	0	0.0
	豚由来DNA	44	0	0.0
		試験検体数	検出数	検出率 (%)
総合判定	ほ乳動物由来たん白質・DNA	44	0	0.0

注 1) モリナガキットによる

#### 4 まとめ

牛海綿状脳症の発生防止対策の一環として、平成18年度に採取した動物質性飼料199検体、国内牛用配混合飼料185検体及び輸入飼料44検体について、顕微鏡鑑定、ELISA試験及びPCR試験により動物由来たん白質等のモニタリングを実施した結果は、次のとおりであった。

- 1) チキンミール31検体及びフェザーミール23検体の計54検体について、ほ乳動物由来たん白質のモニタリングを実施した結果は、ELISA試験で陽性のものが9検体あったが、PCR試験の結果はすべてほ乳動物由来DNAが検出されず、総合判定ではすべてほ乳動物由来たん白質等が不検出であった。
- 2) チキンミール17検体及びフェザーミール15検体を用いて、モリナガキットとメライザキットの試験結果を比較したところ、これらの試料にはメライザキットを適用するのが適当であると判断された。
- 3) 国内製造魚粉等107検体についてはほ乳動物由来たん白質のモニタリングを実施した結果、ほ乳動物由来たん白質等が検出されたものはなかった。
- 4) 豚肉骨粉及び鶏豚原料混合肉骨粉27検体について反すう動物由来たん白質のモニタリングを実施した結果は、鶏豚原料混合肉骨粉1検体で反すう動物由来たん白質等が検出された。製造事業場の工程の洗浄クリーニングを実施した後に再度検体を採取し検査したところ、反すう動物由来たん白質は検出されなかった。
- 5) 国内製造の牛用配混合飼料185検体について、ほ乳動物由来たん白質等のモニタリングを実施した結果は、ほ乳動物由来たん白質等が検出されたものはなかった。ELISA試験では、12検体で牛由来たん白質が陽性であったが、乳製品等除去処理によるPCRを実施した結果は、いずれも牛由来DNAが検出されたものはなく、これらは、法令上牛用飼料への使用が認められている乳製品の混入等によるものと推察された。
- 6) 輸入の牛用混合飼料36検体及び牛用飼料添加物2検体及び植物性単体飼料6検体について、ほ乳動物由来たん白質のモニタリングを実施した結果、12検体でELISA試験が陽性であったが、乳製品等除去処理PCRを実施した結果は、ELISA及びPCR試験で一致して陽性のものはなく、総合的に不検出と判定された。

#### 文 献

<分析法通知関係>

- 1) 農林水産省生産局長通知：“反すう動物用飼料への反すう動物由来たん白質の混入防止に関するガイドラインの制定について”，平成13年6月1日，13生畜第1366号（2001）。
- 2) 農林水産省生産局長通知：“飼料中の動物由来たん白質等の検査法について”，平成14年4月9日，14生畜第181号（2002）。  
最終改正 農林水産省消費・安全局長通知：“「飼料中の動物由来たん白質等の検査法について」の改正について”，平成18年3月17日，17消安第12305号（2006）。  
（（独）農林水産消費安全技術センターホームページ（飼料関係／分析法）：  
<http://www.ffis.famic.go.jp/>）  
廃止 平成20年4月1日付で飼料分析基準<sup>4)</sup>に記載され、本通知は廃止された。
- 3) 飼料分析基準研究会編：“飼料分析法・解説”第18章 動物由来たん白質・DNA（社団法人日本科学飼料協会発行）（2004）。

4) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号(2008).

5) 農林水産省畜産局長通知：“飼料等検査実施要領の制定について”，昭和 52 年 5 月 10 日，52 畜 B 第 793 号 (1977).

<動物由来たん白質のモニタリング関係>

6) 草間豊子，日比野 洋，野村哲也，石橋隆幸：飼料研究報告，29，244 (2004).

7) 草間豊子，日比野 洋，野村哲也，風間鈴子，関口好浩，西村真由美，内山 丈，古川 明，中村行伸，小森谷敏一，堀切正賀寿，三井（小宮）友紀子，千原哲夫，青山恵介，井上智江，下村正之，鬼頭敦司，松崎 学，牧野大作，松崎美由紀：飼料研究報告，29，252 (2004).

8) 草間豊子，日比野 洋，野村哲也，関口好浩，西村真由美，山本克己，遠藤 剛，石田有希恵，福中理絵，小森谷敏一，堀切正賀寿，三井友紀子，中村志野，井上智江，吉田知太郎，鬼頭敦司，松崎 学，屋方光則，牧野大作，林 美紀子，松崎美由紀，児玉恭子：飼料研究報告，30，138 (2005).

9) 草間豊子，日比野 洋，野村哲也，野口 淳，遠藤 剛，西村真由美，高橋亜紀子，白澤優子，山本克己，福中理絵，森 有希子，下村正之，小森谷敏一，堀切正賀寿，三井友紀子，牧野大作，吉田知太郎，鬼頭敦司，荒木誠士，屋方光則，林 美紀子，永原貴子，松崎美由紀，児玉恭子：飼料研究報告，31，228 (2006).

10) 草間豊子：飼料研究報告，32，203 (2007).

<PCR 試験法関係>

11) T. Kusama, T. Nomura, and K. Kadowaki: J. Food Protection, 67 (6), 1289 (2004).

12) 野村哲也，草間豊子，門脇光一：食品衛生学雑誌，47 (5)，222 (2006).

13) 野村哲也，草間豊子：飼料研究報告，30，52 (2005).

14) 草間豊子，野村哲也：飼料研究報告，30，60 (2005).

15) 草間豊子：飼料研究報告，30，79 (2005).

16) 草間豊子，関口好浩：飼料研究報告，31，147 (2006).

<ELISA 試験法関係>

17) 日比野 洋：飼料研究報告，29，181 (2004).

18) 日比野 洋：飼料研究報告，31，155 (2006).

19) 関口好浩，草間豊子：（社）日本食品衛生学会第 92 回学術講演会講演要旨集，83 (2006).

20) 関口好浩，草間豊子：飼料研究報告，32，78 (2008).

## 飼料研究報告編集委員

委員長	杉浦 勝明	副委員長	片山 信浩
	草間 豊子		橋本 亮
	功刀 豊		早川 俊明
	小森谷 敏一		山谷 昭一
	菅野 清		山多 利秋

## 飼料研究報告 第33号

発行 独立行政法人農林水産消費安全技術センター  
埼玉県さいたま市中央区新都心2番地1  
さいたま新都心合同庁舎検査棟  
TEL 048-601-1176  
FAX 048-601-1179  
<http://www.famic.go.jp/>

平成20年4月

編集 飼料研究報告編集委員会