

飼料研究報告

第36号

平成23年

Research Report of Animal Feed

Vol. 36
2011



The OIE Collaborating Centre for
Animal Feed Safety and Analysis

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
Food and Agricultural Materials Inspection Center
(Incorporated Administrative Agency)
OIE Collaborating Centre for Animal Feed Safety and Analysis
Saitama, Japan

はしがき

『飼料研究報告』は、独立行政法人農林水産消費安全技術センターの飼料検査担当職員らが飼料及び飼料添加物の分析・鑑定技術の改善、検査・試験法の開発等を目指して行った調査・研究内容を毎年とりまとめているものです。今号は、昭和41年度の創刊以来36巻目の発刊となります。

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）は、「農場から食卓まで一連の行程（フードチェーン）」を通じた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、未承認遺伝子組換え体飼料の検出法・定量法の開発などを行っております。

また、2009年6月に愛がん動物用飼料の安全性の確保に関する法律が施行され、愛がん動物用飼料（ペットフード）又はその原材料の法令への適合状況を確認するための検査は、FAMICの理事長が定めた方法によることとされたことを受けて、2009年9月に愛がん動物用飼料等の検査法を制定いたしました。そのことから、ペットフード等を対象にした分析法の研究開発も求められているところであり、今回から、一般成分（水分）、農薬、かび毒及び添加物の定量法といった研究成果も本研究報告でとりまとめております。

さらに、FAMICは、2009年5月に「飼料の安全及び分析」の分野で、国際獣疫事務局（OIE）コラボレーティング・センターに指定されました。2010年7月にはアジア太平洋地域のOIE加盟国を対象とした国際会議を主催し、わが国における飼料の安全及び分析に関する講演を行うとともに参加各国の飼料規制や検査体制について情報交換・討議を行いました。これらを踏まえ、FAMICにおいてはより一層の信頼性確保・分析法開発とともに、開発した技術の国際的な普遍化、OIE加盟国への伝達、さらには、飼料の安全性確保に関する情報の世界に向けた発信など一層の国際貢献に取り組んでまいります。

今回とりまとめた飼料及び愛がん動物用飼料中の各成分の定量法は、既に公定法として農林水産省より通知されている「飼料分析基準」及びFAMICの理事長が制定いたしました「愛がん動物用飼料等の検査法」の一部改正に際して収載されるほか、飼料に関しましては2009年12月に発刊された解説書『飼料分析法・解説 -2009-』（飼料分析基準研究会編著）の改訂の際、追加収載されるものと考えております。本研究報告が、飼料及び飼料添加物並びに愛がん動物用飼料の品質と安全性の確保の一助となることを期待します。

今後のFAMICの技術レベルの向上のため、関係各位には引き続き御指導、御鞭撻頂きますようお願い申し上げます。

平成23年8月

理事長 吉羽 雅昭

謝 辞

本報告に掲載された分析法の開発及び報告書の作成に当たり、御助言頂きました下記の飼料分析基準検討会の各委員に感謝申し上げます。

平成 22 年度飼料分析基準検討会委員
(敬称略。五十音順。御役職は平成 23 年 3 月時点。)

- | | |
|--------|--|
| 青木 葉一 | 財団法人畜産生物科学安全研究所 理事 (分析試験研究部担当) |
| 浅井 鉄夫 | 農林水産省動物医薬品検査所 検査第二部上席主任研究官 |
| 石黒 瑛一 | 財団法人日本食品分析センター 顧問 |
| 永西 修 | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
畜産草地研究所 畜産温暖化研究チーム長 |
| 箴島 豊 | 国立大学法人九州大学名誉教授 |
| 小田中 芳次 | 財団法人日本植物調節剤研究協会 研究所 技術顧問 |
| 萱野 曉明 | 独立行政法人農業生物資源研究所産学官連携推進室 上級研究員 |
| 後藤 哲久 | 国立大学法人信州大学農学部応用生命科学科 教授 |
| 中島 正博 | 名古屋市衛生研究所 生活環境部長 |
| 永山 敏廣 | 東京都健康安全研究センター 医薬品部長 |
| 堀江 正一 | 大妻女子大学 家政学部食物学科 食安全学教授 |
| 松井 徹 | 国立大学法人京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻
動物機能開発学講座 動物栄養科学教授 |
| 松本 清 | 崇城大学 生物生命学部応用微生物工学科
食品生物科学講座 教授 |
| 南澤 正敏 | 財団法人日本穀物検定協会 常務理事 |
| 宮崎 茂 | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
動物衛生研究所 研究管理監 (北海道担当) |
| 森 康行 | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
動物衛生研究所 ヨーネ病研究チーム長 |
| 安井 明美 | 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所 企画管理部業務推進室 専門員 |

目 次

1	飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法 大島 慎司	1
2	配合飼料中のクエン酸モランテルの液体クロマトグラフによる定量法の改良 野村 昌代	13
3	飼料中の動物由来 DNA 検出法における RFLP を用いた確認試験法 橋本 仁康, 篠田 直樹	32
4	愛がん動物用飼料（ウェット製品）中の水分の測定法 石橋 隆幸, 石田 亜希子, 田端 麻里	41
5	愛がん動物用飼料（ウェット製品）中のクロルピリホスメチル, ピリミホスメチル及びマラチオンのガスクロマトグラフによる同時定量法 屋方 光則	54
6	愛がん動物用飼料中のソルビン酸の液体クロマトグラフによる定量法 矢野 愛子	71
技術レポート		
1	ライグラス中のロリトレムBの液体クロマトグラフによる定量法の改良 細貝 明理	82
2	飼料中の牛由来たん白質検出法における「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キットVer.2」の検討 武田 然也, 橋本 仁康, 山本 貴之	91
3	共通試料による飼料中の水銀の共同試験 小森谷 敏一, 甲斐 茂浩, 齋藤 晴文, 岡田 かおり, 高橋 雄一, 佐古 理恵	101
4	愛がん動物用飼料（ウェット製品）中のアフラトキシン B ₁ , B ₂ , G ₁ 及び G ₂ の液体クロマトグラフによる同時定量法の共同試験 野崎 友春, 岩田 典子	103

- 5 愛がん動物用飼料（ウェット製品）中のデオキシニバレノールの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の共同試験
吉村 哲史, 高橋 雄一, 山多 利秋 114
- 6 愛がん動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムの分光光度計による定量法の共同試験
甲斐 茂浩 120

精度管理

- 1 平成 22 年度飼料の共通試料による分析鑑定について
大島 慎司, 松尾 信吾, 佐藤 梢, 岡田 かおり,
吉村 哲史, 野村 晋平 126

調査資料

- 1 飼料中の有害物質等のモニタリング結果について（平成 22 年度）
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課 156
- 2 飼料中のダイオキシン類のモニタリング結果について（平成 18~22 年度）
山本 謙吾, 山多 利秋, 小野 雄造 180
- 3 特定飼料添加物国家検定結果（平成 22 年度）
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課 186

他誌掲載論文（抄録）

- 1 Four-Year Surveillance for Ochratoxin A and Fumonisin in Retail Foods in Japan
Koji AOYAMA, *et al.*
(*Journal of Food Protection*, 73(2), 344–352 (2010).) 197
- 2 Simultaneous analysis of organic acids and inorganic anions in silage by capillary electrophoresis
Hisaaki HIRAOKA, Eiichi ISHIKURO and Tetsuhisa GOTO
(*Animal Feed Science and Technology*, 161, 58–66 (2010).) 197
- 3 PCR-RFLP Identification of Prohibited Animal Derived DNA in Animal Feed
Naoki SHINODA, Yoshiyasu HASHIMOTO,
Masami TAKAGI, Fumio KOJIMA,
Takashi ONODERA and Katsuaki SUGIURA
(*Food Hygiene and Safety Science*, 52(1), 24–27 (2011).) 198

4 Guidelines used in Japan to prevent the contamination of feed products with undesirable substances

Masami TAKAGI, Shoichi YAMATANI

and Katsuaki SUGIURA

(*Veterinaria Italiana*, 47(1), 49-52 (2011).) 198

CONTENTS

1	Determination of Melamine in Feeds by LC-MS/MS Shinji OSHIMA	1
2	Improved Determination Method of Morantel Citrate in Formula Feeds by LC Masayo NOMURA	13
3	PCR-RFLP Identification of Prohibited Animal-derived DNA in Animal Feeds Yoshiyasu HASHIMOTO and Naoki SHINODA	32
4	Determination of Moisture Content in Wet Type Pet Foods Takayuki ISHIBASHI, Akiko ISHIDA and Mari TABATA	41
5	Determination of Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion in Wet Type Pet Foods by GC-FPD Mitsunori YAKATA	54
6	Determination of Sorbic Acid in Pet Foods by LC Aiko YANO	71
§ Technical report		
1	Improved Determination Method of Lolitrem B in Ryegrass by LC Ari HOSOKAI	82
2	Assessment of Morinaga ELISA Kit Ver.2 Detecting Bovine Protein in Feeds Zena TAKEDA Yoshiyasu HASHIMOTO and Takayuki YAMAMOTO	91
3	Interlaboratory Study of Mercury in Feeds Toshiichi KOMORIYA, Shigehiro KAI, Harufumi SAITOU, Kaori OKADA, Yuuichi TAKAHASHI and Rie SAKO	101
4	Collaborative Study of Determination of Aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ and G ₂ in Wet Type Pet foods by LC-FL Tomoharu NOZAKI and Noriko IWATA	103

5 Collaborative Study of Determination of Deoxynivalenol in Wet Type Pet Foods by LC-MS Satoshi YOSHIMURA, Yuuichi TAKAHASHI and Toshiaki YAMATA	114
6 Collaborative Study of Determination of Sodium Nitrite in Pet Foods by Spectrophotometric Analysis Shigehiro KAI	120
§ Proficiency test	
1 Proficiency Test in the fiscal 2010 Shinji OSHIMA, Shingo MATSUO, Kozue SATOU, Kaori OKADA, Satoshi YOSHIMURA and Shinpei NOMURA	126
§ Investigative report	
1 Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the fiscal 2010) Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	156
2 Monitoring Results of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in Feeds (in the fiscal 2006~2010) Kengo YAMAMOTO, Toshiaki YAMATA and Yuzo ONO	180
3 National assay results of specified feed additives (in the fiscal 2010) Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	186
§ Papers accepted in other journal (abstract)	
1 Four-Year Surveillance for Ochratoxin A and Fumonisin in Retail Foods in Japan Koji AOYAMA, <i>et al.</i> (<i>Journal of Food Protection</i> , 73(2), 344–352 (2010).)	197
2 Simultaneous analysis of organic acids and inorganic anions in silage by capillary electrophoresis Hisaki HIRAOKA, Eiichi ISHIKURO and Tetsuhisa GOTO (<i>Animal Feed Science and Technology</i> , 161, 58–66 (2010).)	197
3 PCR-RFLP Identification of Prohibited Animal Derived DNA in Animal Feed Naoki SHINODA, Yoshiyasu HASHIMOTO, Masami TAKAGI, Fumio KOJIMA, Takashi ONODERA and Katsuaki SUGIURA (<i>Food Hygiene and Safety Science</i> , 52(1), 24–27 (2011).)	198

4 Guidelines used in Japan to prevent the contamination of feed products with undesirable substances
Masami TAKAGI, Shoichi YAMATANI
and Katsuaki SUGIURA
(*Veterinaria Italiana*, 47(1), 49-52 (2011).) 198

1 飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

大島 慎司*

Determination of Melamine in Feeds by LC-MS/MS

Shinji OSHIMA*

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

An analytical method for determination of melamine in feeds using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was developed. After addition of 20 mL of acetonitrile-water (1:1) and Melamine- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$, the sample was homogenized. The extract was centrifuged for 10 min at $1,600 \times g$ and 4 mL of the supernatant was filled up to 10 mL with acetonitrile-water (1:1). The sample solution was purified by strong acidic cation-exchange mini column (Waters, Oasis MCX) with 4 mL of acetonitrile-diethylamine (49:1) and subjected to LC-ESI-MS/MS for determination of melamine. The LC separation was carried out on an hydrophilic interaction chromatography column (MERCK, SeQuant ZIC-HILIC, 2.1 mm i.d. \times 150 mm, 5 μm) using 10 mmol/L ammonium acetate solution-acetonitrile (17:3) as a mobile phase. The determination was performed in a selected reaction monitoring (SRM) mode. A spiked test was conducted with two kinds of formula feed, fish meal, soybean meal and dried skim milk spiked with 0.2 and 1 mg/kg of melamine. The spike test resulted in recoveries ranging from 93.0 % to 117 % of melamine and in relative standard deviations (RSD) within 3.6 % respectively.

Key words: melamine ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer(LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; hydrophilic interaction chromatography ; feed ; fish meal ; soybean meal ; dried skim milk

キーワード：メラミン；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；親水性相互作用クロマトグラフィー；飼料；魚粉；大豆油かす；脱脂粉乳

1 緒 言

メラミンは、メラミン樹脂（メラミンとホルムアルデヒドを主体として縮合させた合成樹脂）の原料として使用されている。その他、ラミネート等の幅広い工業用途に用いられている。また、殺虫剤であるシロマジンが代謝されてメラミンが生成されることが知られている。

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

*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

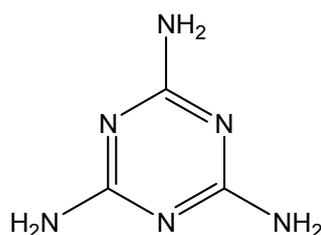
これらの事態を受け、今般、コーデックス委員会汚染物質部会において、食品及び飼料中のメラミンの基準値を 2.5 mg/kg とすることです承され、総会で採択されるに至っている。一方、我が国においても同様に、国内における飼料中の基準値の設定が検討されているところである。

飼料中のメラミンの分析法としては、米国食品医薬品局（FDA）よりガスクロマトグラフ質量分析計による方法²⁾が示されているが、この方法では 10 mg/kg 以下の飼料中のメラミンの含有実態を正確に把握し得ない状況下にある。

また、この他に、低濃度まで定量可能な液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた厚生労働省通知試験法³⁾が示されている。この方法を用いて、平成 21 年度に、国内基準値設定のために各種飼料を対象にしたメラミン汚染実態調査を実施したが、標準液の測定は問題ないものの試料溶液中の内標準の回収率が著しく低く、定量が困難であった。飼料を対象にした場合は、前処理法を改良する必要が認められた。

そこで、FDA が新たに示した、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による方法⁴⁾（以下「FDA 法」という。）の前処理方法を基に検討し、飼料分析基準⁵⁾への適用の可否について検討したので、その概要を報告する。

なお、メラミンの構造式を Fig 1 に示した。



Melamine

C₃H₆N₆ MW: 126.12

CAS No.: 108-78-1

Fig. 1 Chemical structure of melamine

2 実験方法

2.1 試料

市販の配合飼料（鶏用及び豚用配合飼料）、魚粉、大豆油かす及び脱脂粉乳をそれぞれ 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

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layer	Grains	61	Corn, Milo, Polished rice
	Oil seed meal	22	Soybean meal, Corn gluten meal, Rapeseed meal
	Brans	3	Corn gluten feed
	Animal by-products	2	Fish meal
	Others	12	Calcium carbonate, Animal fat, Calcium phosphate, Salt, Paprika extract, Enzyme processed copra meal, Silicic acid, Feed additives
For growing pig	Grains	66	Corn, Milo, Polished rice, Barley
	Oil seed meal	16	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn germ meal
	Brans	5	Corn gluten feed, Rice bran
	Animal by-products	2	Fish meal, Meat and bone meal (derived from pork and poultry)
	Others	11	Dried leftover, Animal fat, Molasses, Calcium carbonate, Salt, Vegetable oil, Feed yeast, Bakery waste, Feed additives

2.2 試薬等

1) メラミン標準原液

メラミン標準品（和光純薬工業製，純度 98.0 %）10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリル-水（1+1）を加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてメラミン標準原液を調製した（この液 1 mL は，メラミンとして 100 μg ($f=0.980$) を含有する.）.

2) 安定同位体元素標識メラミン（メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ ）内標準液

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

3) 検量線作成用標準液

使用に際して，メラミン標準原液及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 内標準液の一定量をアセトニトリル-ジエチルアミン（49+1）で正確に希釈し，1 mL 中にメラミンとして 1, 5, 10, 50, 100, 150 及び 200 ng を含有し，かつメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ として 5 ng を含有する各検量線作成用標準液を調製した.

4) アセトニトリルは液体クロマトグラフ用試薬を用いた. 特記した以外の試薬については特級を用いた.

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計：

LC 部：Agilent Technologies 製 1200 Series

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

2) 超音波処理装置：SHARP 製 UT-204（最大出力 200 w，39 kHz）

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

4) 遠心分離器：KOKUSAN 製 H-36

5) 強酸性陽イオン交換体ミニカラム：Waters 製 Oasis MCX（充てん剤量 150 mg）

6) 吸引マニホールド：GL Sciences 製

7) ボルテックスミキサー：ヤマト科学製 MT-31

8) メンブランフィルター: 関東化学製 HLC-DISK 13 溶媒系 (孔径 0.45 μm , 直径 13 mm, PTFE)

2.4 定量方法

1) 抽出

i 脱脂粉乳 分析試料 1 g を正確に量って 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ, 水 10 mL を加えた後, 15 分間超音波処理した. この遠心沈殿管にアセトニトリル 10 mL を加え, 更にメラミン- $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$ 内標準液 0.5 mL を正確に加えた後, ホモジナイザーで 1 分間かき混ぜて抽出した.

抽出液を 1,600 \times g (3,000 rpm) で 10 分間遠心分離し, 上澄み液 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れた. 全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (1+1) を加え, カラム処理に供する試料溶液とした.

ii その他の飼料 分析試料 1 g を正確に量って 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ, アセトニトリル-水 (1+1) 20 mL を加えた. 更にこの遠心沈殿管にメラミン- $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$ 内標準液 0.5 mL を正確に加えた後, ホモジナイザーで 1 分間かき混ぜて抽出した.

抽出液を 1,600 \times g (3,000 rpm) で 10 分間遠心分離し, 上澄み液 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れた. 全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (1+1) を加え, カラム処理に供する試料溶液とした.

2) カラム処理

強酸性陽イオン交換体ミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及びぎ酸 (1+24) 5 mL で洗浄した.

試料溶液 2 mL をあらかじめぎ酸 (1+24) 3 mL を入れたミニカラムに加え, 添加した試料溶液を混和し, 液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. 更にアセトニトリル 5 mL 及びアセトニトリル-ジエチルアミン (499+1) 5 mL を順次ミニカラムに加えて洗浄した後, 圧注して全量を流出させた.

10 mL の共栓試験管をミニカラムの下に置き, アセトニトリル-ジエチルアミン (49+1) 4 mL をミニカラムに加えてメラミンを溶出させた後, 圧注して全量を溶出させ混合した.

溶出液をメンブランフィルター (孔径 0.45 μm 以下) でろ過し, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とした.

3) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各検量線作成用標準液各 5 μL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (以下「LC-MS/MS」という.) に注入し, Table 2 及び Table 3 の測定条件に従って選択反応検出クロマトグラムを得た.

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS for analyzing melamine

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

Table 3 MS/MS Parameters

Substance	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	Fragmentor (V)	Collision (eV)
Melamine	127	68	85	100	33
Melamine- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃	133	89		100	18

4) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムからメラミン及びメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のメラミン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Sample 1 g

- add 20 mL of acetonitrile-water (1:1) (Dried skim milk ; add 10 mL of water, and add 10 mL of acetonitrile after ultrasonic treatment for 15 min)
- add 0.5 mL of internal standard solution
- homogenize for 1 min at 10,000 rpm
- centrifuge for 10 min at 1,600×g
- 4 mL of supernatant fill up to 10 mL with acetonitrile-water (1:1)

Oasis MCX

- prewash with 5 mL acetonitrile and formic acid (1:24)
- transfer 2 mL of sample solution into 3 mL of formic acid (1:24) and apply
- wash with 5 mL acetonitrile and acetonitrile-diethylamine (499:1)
- elute with 4 mL acetonitrile-diethylamine (49:1)
- filter with a membrane filter (0.45 μm)

LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for melamine in feeds

3 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS 測定条件

厚生労働省通知試験法³⁾の測定条件を基にして、Table 2 及び Table 3 のとおり測定条件を決定した。ただし内標準については、メラミン-¹³C₃¹⁵N₃の定量イオンについて記載されている FDA 法⁴⁾の条件を採用した。

また、液体クロマトグラフの溶離液条件については、連続して測定した際、試料溶液中のジェチルアミンがカラムに残存することにより、感度が低下する傾向が認められたため、測定対象物質の溶出後にグラジェント溶出でカラムを洗浄することとした。

3.2 絶対検量線法と内標準法の検討

厚生労働省通知試験法³⁾及び FDA 法⁴⁾では内標準法による定量を採用している。そこで、本法における内標準法の必要性について検討した。

2.1 で調製した肉豚肥育用配合飼料、魚粉及び脱脂粉乳にメラミンとして 2.5 mg/kg 相当量添加した試料を用いて、本法に従って 3 点併行分析を実施し、絶対検量線法及び内標準法におけるそれぞれのメラミンの回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は、Table 4 のとおり、絶対検量線法では平均回収率 43.6~79.0%，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。内標準法では平均回収率 95.6~99.5%，その繰返し精度は、RSD として 3.1%以下であった。

魚粉及び脱脂粉乳において絶対検量線法では回収率が低く定量が困難であった。また、いずれの試料においても絶対検量線法と比較して内標準法による定量結果の方が良好な結果となったことから、本法においても内標準法による定量を採用することとした。

Table 4 Recoveries for melamine by absolute calibration method and internal standard method

Spiked level (mg/kg)	Kind of sample	Absolute calibration method		Internal standard method	
		Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
		(%)	(%)	(%)	(%)
2.5	Formula feed for growing pig	79.0	4.3	95.6	3.1
	Fish meal	43.6	1.3	99.5	1.4
	Dried skim milk	58.9	11	98.7	2.9

a) Mean(n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.3 検量線の作成

2.2 の 3)に従って調製した検量線作成用標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムからメラミン及びメラミン-¹³C₃¹⁵N₃のピーク面積比を求めて検量線を作成した。その結果、検量線は Fig 2 のとおり、メラミンとして 1~200 ng/mL (注入量として 5~1000 pg) の範囲で直線性を示した。

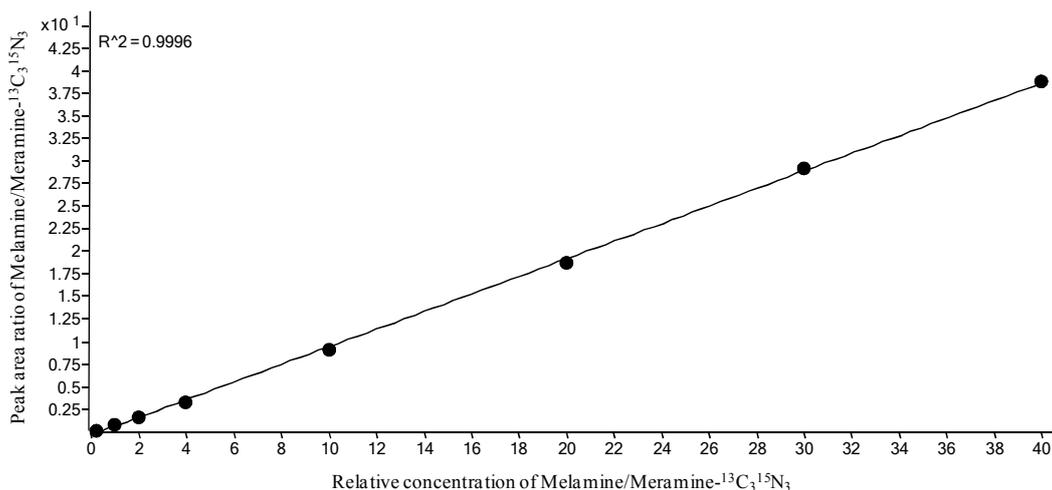


Fig. 2 Calibration curve of melamine by area

3.4 試料採取量の検討

1) 試料と抽出溶媒の比率の検討

FDA 法⁴⁾では試料 5 g にアセトニトリル-水 (1+1) 20 mL で抽出することとしている。始めに、魚粉にメラミンとして 1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて FDA 法⁴⁾への適用を確認したところ、内標準法によるメラミンの回収率は良好であったが、内標準であるメラミン-¹³C₃¹⁵N₃の回収率が 40 %を下回る結果であった。

内標準の回収率が良好でない原因は夾雑成分を原因とするイオン化抑制であると推定し、イオン化抑制を軽減するためにメラミン-¹³C₃¹⁵N₃の回収率を指標として、魚粉にメラミンとして 1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて次の検討を行った。

試料と抽出溶媒の比率が 1:20, 1:10 及び 1:4 となるように、試料の採取量を 1, 2 及び 5 g と変え、アセトニトリル-水 (1+1) 20 mL 及びメラミン-¹³C₃¹⁵N₃内標準液 200 µL を正確に加えそれぞれ抽出した。抽出液を 1,600×g (3,000 rpm) で 10 分間遠心分離した後、上澄み液 2 mL を 2.4 の 2)のカラム処理に供する試料溶液とし、以下本法に従って分析を実施した。

その結果は、Table 5 のとおりであり、試料採取量を 1 g にすることによりメラミン-¹³C₃¹⁵N₃の回収率が 40 %以上となった。このことから、以降の検討では試料 1 g に対して 20 mL の比率になるように抽出溶媒を用いることとした。

Table 5 Recoveries of Melamine-¹³C₃¹⁵N₃ by each ratio of sample weight and extracting solvent

Kind of sample	Sample weight (g)	Sample : Solvent (g : mL)	Melamine- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃
			Recovery ^{a)} (%)
Fish meal	1	1 : 20	48.3
	2	1 : 10	33.7
	5	1 : 4	19.6

a) Mean(n=1)

2) 試料採取量の妥当性確認

飼料分析基準では、通常有害物質の定量に際して、その対象成分の試料中での偏在を考慮し

て、5 g 以上を採取していることが多いことから、先に決めた試料採取量 1 g が採取量として妥当であるか確認するため、メラミンで汚染が確認されている魚粉及び下記 i により調製した試料を用いて次の検討を行った。

i : 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎した市販の成鶏飼育用配合飼料 100 g にメラミンとして 2.5 mg/kg 相当量となるようにメラミン標準液を添加した後、溶媒が十分に揮発するまで静置した。その後 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎して再度均一化を行い、供試試料とした。

試料 1 g に対して 20 mL の抽出溶媒、試料 2 g に対して 40 mL の抽出溶媒及び試料 4 g に対して 80 mL の抽出溶媒を加え、3.4 の 1)と同様にカラム処理に供する試料溶液を調製し、以下本法に従って 3 点併行分析を実施し、メラミンの定量値及び繰返し精度を求めた。

結果を Table 6 に示した。定量値及び繰返し精度に差は認められず、試料採取量 1 g でも問題なかったことから試料採取量を 1 g、抽出溶媒を 20 mL とした。

Table 6 Quantitative value of melamine by each sample weight

Kind of sample	Sample weight (g)	Extracting solvent (mL)	Melamine ^{a)} (mg/kg)	RSD ^{b)} (%)
Fish meal	1	20	4.5	3.2
	2	40	4.6	5.5
	4	80	4.4	2.5
Formula feed for layer	1	20	2.5	0.7
	2	40	2.4	0.7
	4	80	2.4	0.3

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.5 脱脂粉乳への適用の検討

1) 抽出方法の検討

脱脂粉乳にアセトニトリル-水 (1+1) を加え抽出を試みたところ、試料と抽出溶媒が混和せずに固化し、抽出操作が困難であった。そこで、アセトニトリルと水を別々に加えることとし、下記の A、B 及び C 法を検討した。

- ・A 法：水 10 mL を加え、30 分静置した後、アセトニトリル 10 mL を加えた。
- ・B 法：水 10 mL を加え、ボルテックスミキサーでかき混ぜた後、アセトニトリル 10 mL を加えた。
- ・C 法：水 10 mL を加え、15 分間超音波処理した後、アセトニトリル 10 mL を加えた。

その結果、A 法では試料によっては、単に水を加えただけでは水と混和しない場合があり、何らかの操作が必要と考えられた。そこでボルテックスミキサーでかき混ぜる B 法及び超音波処理を行う C 法を検討した。その結果、B 法では、遠心沈殿管の壁面に試料が固着する場合があったのに対して、C 法では特に問題なく、水と混和させることが可能であった。

このことから、以後の検討では、脱脂粉乳の場合、C 法により抽出することとした。

なお、メラミン-¹³C₃¹⁵N₃ 内標準液の溶媒はアセトニトリル-水 (1+1) であり、脱脂粉乳に直

接加えると同様に固まってしまったため、アセトニトリルを加えた後に内標準液を加えることとした。また、その他の試料についても同様に、内標準液は試料に直接加えず、アセトニトリル-水 (1+1) を加えた後に加えることとした。

2) 希釈操作の検討

脱脂粉乳にメラミンとして 1 及び 5 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、3.4 の 1) で採用した方法で抽出液を加えた後、3.4 の 1) と同様にカラム処理に供する試料溶液を調製し、以下本法に従って 3 点併行分析を実施した。その結果、メラミンの平均回収率は 1 mg/kg 相当量添加した試料で 86.5 %、5 mg/kg 相当量添加した試料で 92.7 % であり良好であったが、内標準であるメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ の平均回収率が 1 mg/kg 相当量添加した試料で 38.9 %、5 mg/kg 相当量添加した試料で 33.6 % であり、40 % を下回る結果であった。

この原因は夾雑成分を原因とするイオン化抑制であると推定したことから、その影響を軽減し、メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ の回収率を十分に確保するため次の検討を行った。

脱脂粉乳にメラミンとして 1 mg/kg 添加した試料を用い、2.4 の 1) に従い遠心分離まで行った抽出液についてアセトニトリル-水 (1+1) にて 2.5、5 及び 10 倍に希釈し、以下本法に従って 3 点併行分析を実施した。なお、内標準液の添加量はそれぞれ 0.5、1 及び 2 mL とした。

結果を、Table 7 に示した。いずれの希釈倍率においてもメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ の回収率は良好な結果であった。このことから、低濃度でのメラミンの測定を考慮すると希釈倍率は 2.5 倍で十分であると考えられたので、以後の検討では、ミニカラムに負荷する前に 2.5 倍希釈する操作を加えることとした。また、その他の試料についても安全をみて同様に 2.5 倍希釈の操作を加えることとした。

Table 7 Comparison of meramine- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ by dilution level

Kind of sample	Dilution level	Melamine- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$
		Recovery ^{a)} (%)
Dried skim milk	1:2.5	62.2
	1:5	68.7
	1:10	76.1

a) Mean(n=3)

3.6 強酸性陽イオン交換体ミニカラムの溶出画分の確認

強酸性陽イオン交換体ミニカラム処理によるメラミン及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ の溶出画分の確認を行った。

魚粉は、2.4 の 1) の ii に従って抽出を行い、カラム処理に供する試料溶液にメラミンとして 1 mg/kg 相当量を添加した。この抽出液を本法に従ってミニカラムに負荷し、洗浄液であるアセトニトリル及びアセトニトリル-ジエチルアミン (499+1) とミニカラムからの溶出液であるアセトニトリル-ジエチルアミン (49+1) の各溶出画分を確認した。

その結果、Table 8 のとおりアセトニトリル-ジエチルアミン (49+1) 4 mL でほぼ溶出され、内標準も同様の挙動を示すことから、本法では FDA 法⁴⁾と同様にアセトニトリル-ジエチルアミン (49+1) 4 mL で溶出することとした。

Table 8 Elution pattern from strong-acid cation exchange mini column

		Acetonitrile	Acetonitrile- Diethylamine (499+1)	Acetonitrile- Diethylamine (49+1)	
		0~5 mL	0~5 mL	0~4 mL	4~8 mL
Melamine	Area (arb.units)	5445	5735	750553	34429
	Relative value ^{a)} (%)	0.73	0.76	100	4.59
Melamin- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃	Area (arb.units)	35	2432	377565	17802
	Relative value ^{a)} (%)	0.01	0.64	100	4.71

a) Ratio to area of acetonitrile-Diethylamine(49+1) 0~4 mL

3.7 妨害物質の検討

配合飼料（成鶏飼育用，肉豚肥育用，ほ乳期子豚用，にじます育成用），魚粉，ポークチキンミール，米ぬか，大豆油かす，コーングルテンミール及び脱脂粉乳を用い，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。

3.8 添加回収試験

2.1 で調製した配合飼料 2 種類（成鶏飼育用及び肉豚肥育用）及び飼料原料 3 種類（魚粉，大豆油かす及び脱脂粉乳）にメラミンとして 2.5 及び 0.2 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて，本法に従って 3 点併行分析を実施し，回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は，Table 9 のとおり，平均回収率 93.0~117 %，その繰返し精度は，相対標準偏差 (RSD) として 3.6 %以下の成績が得られた。

また，内標準として添加したメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ の回収率は 42.4 %以上であった。

なお，添加回収試験で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig 3 に示した。

Table 9 Recoveries for melamine

Spiked level (mg/kg)	Feed types									
	Formula feed for layer		Formula feed for growing pig		Fish meal		Soybean meal		Dried skim milk	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
2.5	93.0	0.9	95.6	3.1	99.5	1.4	98.0	0.6	96.3	2.9
0.2	115	1.1	112	3.0	112	2.6	117	3.6	109	2.9

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

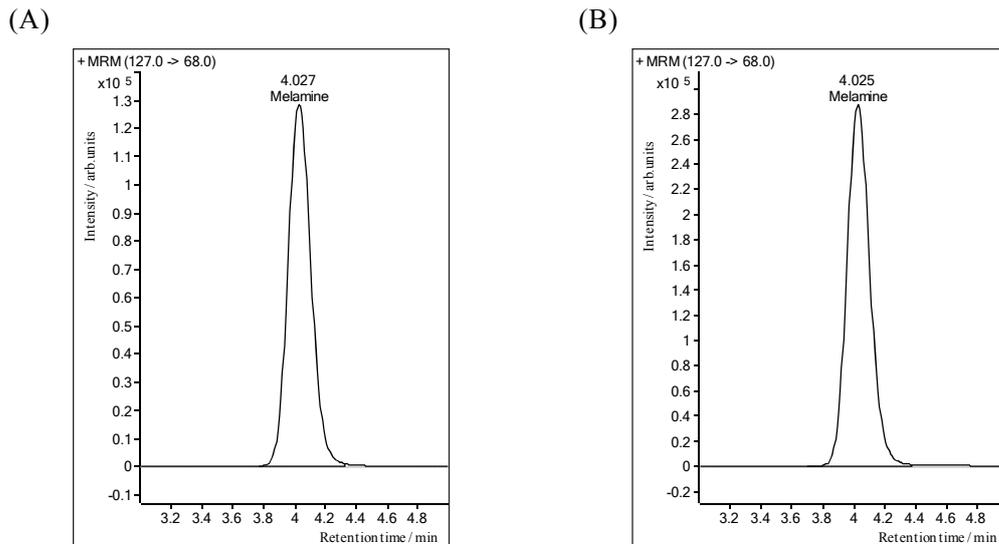


Fig. 3 SRM chromatograms of melamine

(A) Standard solution of melamine (10 ng/mL)

(B) Formula feed for layer spiked melamine at 2.5 mg/kg

3.9 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するために、魚粉及び脱脂粉乳にメラミンを添加し、添加回収試験により得られるピークのSN比が10及び3になる濃度を求めた。

得られたピークのSN比が10以上となる濃度は0.2 mg/kgであった。

確認のために、魚粉及び脱脂粉乳にメラミンとして0.2 mg/kg相当量を添加した試料について、本法により3点併行で定量を行った結果はTable 10のとおりであり、魚粉及び脱脂粉乳において平均回収率は112及び109%、その繰返し精度は相対標準偏差として2.6及び2.9%であった。

また、SN比が3となる濃度は0.06 mg/kgであった。

以上の結果から、本法の定量下限は0.2 mg/kg、検出下限は0.06 mg/kgであった。

Table 10 Recoveries for melamine at the level of limit of quantification

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Fish meal		Dried skim milk	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
0.2	112	2.6	109	2.9

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

4 まとめ

飼料中のメラミンについて、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討し、次の結果を得た。

- 1) 本法は内標準法による定量を採用した。
- 2) 検量線は1~200 ng/mL（注入量として5~1000 pg）の範囲で直線性を示した。

- 3) 試料採取量を 1 g, 抽出溶媒を 20 mL としたところ, 内標準であるメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ の回収率が良好な結果となった.
- 4) 脱脂粉乳では, 抽出操作について, 水を加えてなじませた後に, アセトニトリル及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 内標準液を加えることとした.
- 5) ミニカラムに負荷する前に 2.5 倍希釈する操作を加えることにより, 内標準であるメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ の回収率が良好な結果となった.
- 6) 強酸性陽イオン交換体ミニカラムからの溶出面分を確認した結果, 溶出液量は 4 mL で十分であった.
- 7) 4 種類の配合飼料及び 6 種類の飼料原料について, 本法に従ってクロマトグラムを作成したところ, メラミンの定量を妨げるピークは認められなかった.
- 8) 配合飼料 2 種類 (成鶏飼育用及び肉豚肥育用) 及び飼料原料 3 種類 (魚粉, 大豆油かす及び脱脂粉乳) にメラミンとして 2.5 及び 0.2 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて, 本法に従って 3 点併行分析を実施したところ, 平均回収率 93.0~117 %, その繰返し精度は, 相対標準偏差 (RSD) として 3.6 %以下の成績が得られた.
- 9) 本法によるメラミンの定量下限は, 試料中で 0.2 mg/kg, 検出下限は 0.06 mg/kg であった.

文 献

- 1) 食品安全委員会 : メラミン等による健康影響について, 平成 20 年 10 月 9 日 (2008).
- 2) Jonathan J. Litzau, Gregory E. Mercer and Kevin J. Mulligan: GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide, and Cyanuric Acid, U.S Food and Drug Administration, Laboratory Information Bulletin LIB 4423(24), (2008).
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 : 食品中のメラミンの試験法について, 平成 20 年 10 月 2 日, 食安監発第 1002003 号 (2008).
- 4) Michael Smoker and Alexander J. Krynitsky: Interim Method for Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues In Foods using LC-MS/MS: Version1.0, U.S Food and Drug Administration, Laboratory Information Bulletin LIB 4422, (2008).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知 : 飼料分析基準の制定について, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).

2 配合飼料中のクエン酸モランテルの液体クロマトグラフによる定量法の改良

野村 昌代*

Improved Determination Method of Morantel Citrate in Formula Feeds by LC

Masayo NOMURA*

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

An analytical method for determination of morantel citrate in formula feeds using liquid chromatograph (LC) was improved. First, 10.0 g of sample was added with 100 mL of methanol-water (17:3). For non-heated formula feeds, the samples were extracted at room temperature. For heated formula feeds, the samples were extracted at 40 °C. After the sample solutions were purified by basic alumina column chromatography (Merck, Aluminiumoxid 90 aktiv basisch Art. 1076), and subjected to LC with a UV detector at 320 nm for determination of morantel citrate. The LC separation was carried out on an ODS column (Showa Denko, Shodex C18M4E, 4.6 mm i.d.×250 mm, 5 µm) using phosphoric acid buffer solution-acetonitrile (4:1) as a mobile phase. A recovery test was conducted using three kinds of non-heated formula feeds added with morantel citrate at 15, 30 and 45 g/ton. The mean recoveries of morantel citrate were 90.3~103 % and the relative standard deviations (RSD) were within 4.6 %. A collaborative study was conducted in nine laboratories using two kinds of non-heated formula feeds for growing pig added with morantel citrate at 30 g/ton and heated formula feed for suckling pig designed with morantel citrate at 30 g/ton. The mean recovery of non-heated formula feed for growing pig 1 was 102 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) were 3.5 % and 3.0 % respectively. These values were 102 %, 2.8 % and 3.5 % for non-heated formula feed for growing pig 2 ; 96.4 % (recovery to designed value), 1.0 % and 2.3 % for heated formula feed for suckling pig respectively.

Key words: morantel citrate ; synthetic antibacterial ; feed additives ; formula feed ; liquid chromatograph (LC) ; feed ; collaborative study

キーワード：クエン酸モランテル；合成抗菌剤；飼料添加物；配合飼料；液体クロマトグラフ；飼料；共同試験

1 緒 言

クエン酸モランテルは、我が国においては「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、合成抗菌剤に分類される飼料添加物として指定され¹⁾、ほ乳期子豚育成用及び子豚育成用配合飼料に 30 g/t の添加が認められている²⁾。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

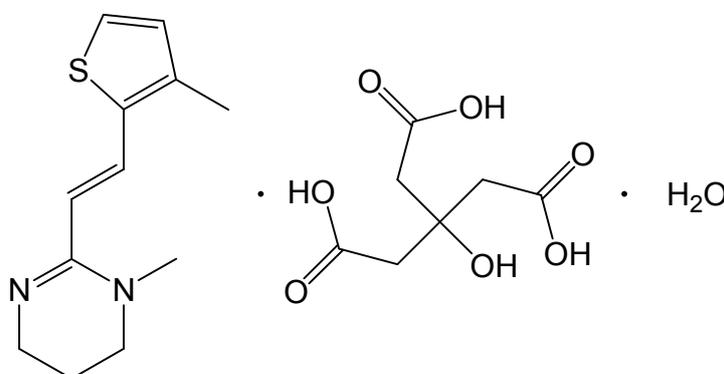
配合飼料中のクエン酸モランテルの定量法については、石黒³⁾、千原ら⁴⁾、松村ら⁵⁾及び山本⁶⁾の報告があり、既に飼料分析基準⁷⁾に記載されている。

現在、飼料分析基準に記載されているオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いて精製を行った後、液体クロマトグラフで定量する方法（以下「現行法」⁶⁾という。）では、一部の配合飼料中のクエン酸モランテルの定量値が低くなる事例が認められており、改良が試みられたが、ミニカラム処理の最適条件をみつけることができず、改良が困難であった。

平成 18 年 5 月まで飼料分析基準に記載されていた、メタノール-水（17+3）で抽出し塩基性アルミナで精製する方法（以下「旧法」⁵⁾という。）の問題点は、加熱試料においてクエン酸モランテルが十分に抽出されず、低回収率を呈する飼料があったことである。

今回、この問題点の改良を中心に、旧法を基にして、加熱処理された配合飼料に適用できる定量法を検討したので、その概要を報告する。

なお、クエン酸モランテルの構造式を Fig. 1 に示した。



1-methyl-2-[(E)-2-(3-methylthiophen-2-yl)ethenyl]-5,6-dihydro-4H-pyrimidine
2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid salt monohydrate
C₁₈H₂₆N₂O₈S MW: 430.47
CAS No.: 69525-81-1

Fig. 1 Chemical structure of morantel citrate

2 実験方法

2.1 試料

非加熱処理の配合飼料（以下、「非加熱試料」という。）については、抗菌性物質を含まない市販の配合飼料（子豚育成用）を用い、それぞれにクエン酸モランテルを含有する複合製剤を添加し、クエン酸モランテルを 15, 30 及び 45 g/t 含有する試料を調製した。

また、加熱処理された配合飼料（以下、「加熱試料」という。）については、クエン酸モランテルを 30 g/t 含有する配合飼料（ほ乳期子豚育成用及び子豚育成用）を用い、比較するために、その同一製造ロットの加熱処理される前（非加熱試料）の配合飼料を用いた。

なお、検討に用いた配合飼料（加熱試料）の一例を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For suckling pig 1	Grains	57	Corn, Extruded soybean
	Oil seed meal	25	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn gluten meal
	Animal by-products	8	Dry whey, Fish meal, Dried skimmed milk
	Brans	1	Rice bran
	Others	9	Bakery waste, Animal fat, Calcium phosphate, Lactose, Calcium carbonate, Salt, Feed additives
For suckling pig 2	Grains	56	Corn
	Oil seed meal	20	Soybean meal
	Animal by-products	10	Fish meal, Dry whey, Dried skimmed milk
	Others	14	Bakery waste, Calcium carbonate, Calcium phosphate, Animal fat, Salt, Feed additives
For suckling pig 3	Grains	50	Corn, Soybean flour
	Oil seed meal	23	Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	5	Fish meal, Dry whey
	Brans	3	Corn distiller's dried grains with solubles
	Others	19	Bakery waste, Animal fat, Calcium phosphate, Calcium carbonate, Salt, Feed additives

2.2 試薬

1) クエン酸モランテル標準液

クエン酸モランテル（（社）日本科学飼料協会販売，純度 99.9 %）25 mg を正確に量って 250 mL の褐色全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてクエン酸モランテル標準原液を調製した（この液 1 mL は，クエン酸モランテルとして 0.1 mg を含有する．）。

使用に際して，標準原液の一定量をメタノール-水（17+3）で正確に希釈し，1 mL 中に 0.1, 1, 2, 3, 4 及び 5 μg を含有する各標準液を調製した。

2) リン酸緩衝液

リン酸二水素カリウム 6.8 g を水に溶かして 1 L にし，リン酸（1+10）で pH を 3.3 に調整した。

3) 塩基性アルミナ

カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（Merck 製 Aluminiumoxid 90 aktiv basisch Art. 1076（粒径 63~200 μm （230~70 メッシュ）））を 130 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間乾燥し，乾燥後，デシケーター内で保管した。

4) アセトニトリル，メタノールは液体クロマトグラフ用を用いた。その他，特記している以外の試薬については特級を用いた。

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ：島津製作所製 Prominence

- 2) 防水マグネチックスターラー：アズワン製 OCTOPUS CS-4 (コントローラー) 及び S-1 (スターラー)
- 3) ウォーターバス：BÜCHI Labortechnik 製 B-490
- 4) 遠心分離器：コクサン製 H-36
- 5) 高速遠心分離器：Sigma Laborzentrifugen GmbH 製 1-14

2.4 定量方法

定量操作は、遮光した状態で行った。

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水 (17+3) 100 mL を加え、加熱試料については、密栓して 40 °C で (非加熱試料については常温で)、30 分間かき混ぜて抽出した。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×g (3,000 rpm) で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

塩基性アルミナ 5 g をカラム管 (内径 10 mm) に乾式充てんし、クリーンアップ用カラムを調製した。

試料溶液をカラムに入れ、初めの流出液 5 mL を捨て、その後の流出液 5 mL のうち一定量を、5,000×g (10,000 rpm) で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフィーによる測定

試料溶液及び各クエン酸モランテル標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、Table 2 の測定条件に従って、クロマトグラムを得た。

Table 2 Operating conditions of LC for analyzing morantel citrate

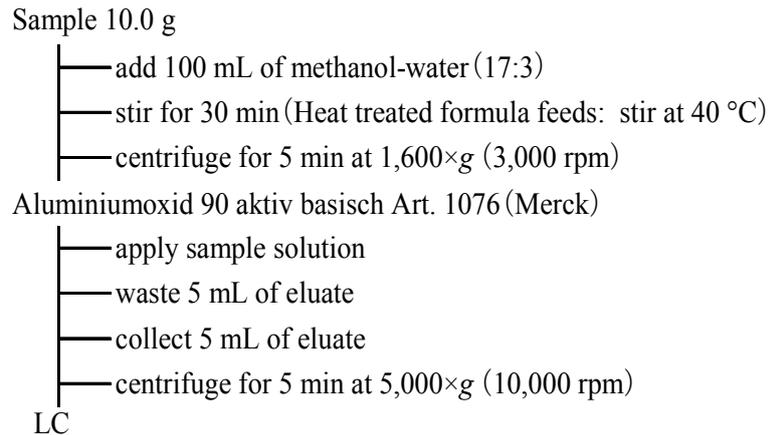
Column	Shodex C18M4E (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 µm)
Mobile phase	phosphoric acid buffer solution*-acetonitrile (4:1)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	UV detector (Wavelength:320 nm)
Column temperature	40 °C

* Dissolve 6.8 g of potassium dihydrogenphosphate to 1L of water, adjust pH to 3.3 with phosphoric acid-water(1:10)

4) 計算

得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のクエン酸モランテル量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for morantel citrate in feeds

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

2.2 の 1) に従って調製した標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積及び又は高さを求めて検量線を作成した。その結果、検量線は Fig. 2 のとおり 0.1~5.0 $\mu\text{g/mL}$ (注入量として 2~100 ng) の範囲で直線性を示した。

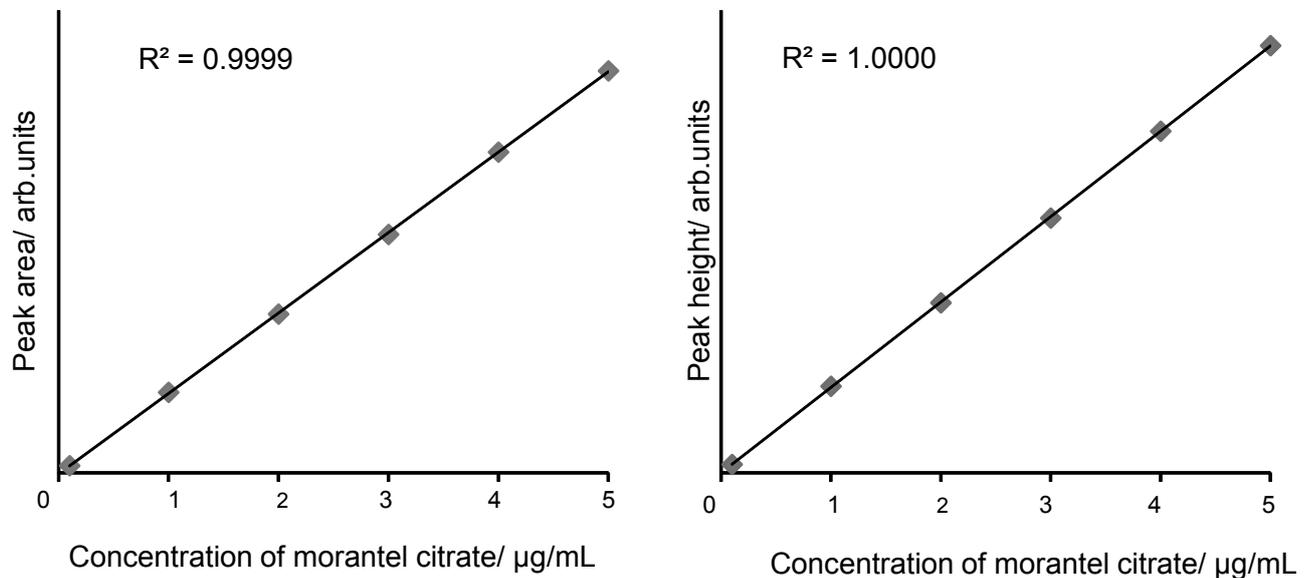


Fig. 2 Calibration curves of morantel citrate by peak area (left) and peak height (right)

3.2 抽出操作の検討

クエン酸モランテルを含有している加熱試料 (ほ乳期子豚育成用及び子豚育成用) 4 種類及びその同一製造ロット加熱処理前の非加熱試料について以下の検討を行った。

1) 旧法及び現行法の抽出溶媒の比較

抽出溶媒として、旧法の抽出溶媒であるメタノール-水 (17+3) ⁵⁾ 及び現行法の抽出溶媒である水-メタノール-酢酸 (15+4+1) ⁶⁾ を用いて、以下旧法に従って定量を行い、抽出溶媒の違い

による加熱処理前後の定量値の比較を行った。

その結果、Table 3 のとおり、抽出溶媒に水-メタノール-酢酸 (15+4+1) を用いると、加熱処理前及び処理後の定量値が変わらないのに対して、メタノール-水 (17+3) を用いると加熱処理後の定量値が若干低下しており、前者の方が良好な結果が得られた。

しかし、Fig. 3 のとおり、抽出溶媒として、メタノール-水 (17+3) 及び水-メタノール-酢酸 (15+4+1) を用いた際のクロマトグラフを比較すると、抽出液中に酢酸が含まれる場合は、夾雑ピークが多く認められ、クエン酸モランテルのピーク前後にも妨害ピークが出現し、一部の試料でクエン酸モランテルのピークと妨害ピークが重なって定量が困難であった。

これらのことから、抽出溶媒に水-メタノール-酢酸 (15+4+1) を採用するのは困難であると考えられた。一方、抽出溶媒として、メタノール-水 (17+3) を用いた際の定量値が低くなる原因を抽出時の温度の影響ではないかと推定し、抽出時の温度条件について検討を行うこととした。

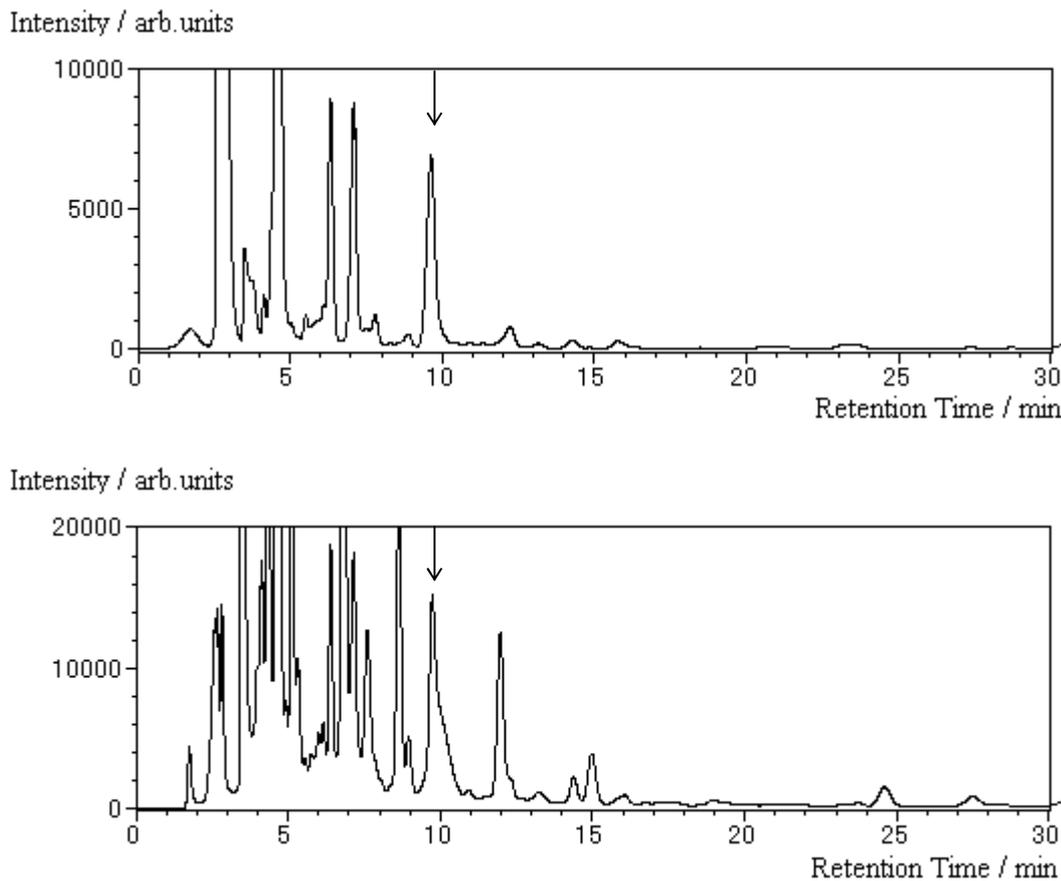


Fig.3 Chromatograms of sample solutions

LC conditions are shown in Table 2.

(Upper) Sample solution by extracting with methanol-water (17:3)

(Lower) Sample solution by extracting with water-methanol-acetic acid (15:4:1)

(The peak of morantel citrate is combined with an interference peak.)

(Arrows indicate the retention time of morantel citrate.)

Table 3 Comparison of recovery to designed value of morantel citrate by heat treatment process of sample and extracting solvent

Formula feed types	Before heat treatment process				After heat treatment process			
	Methanol-water (17:3)		Water-methanol-acetic acid (15:4:1)		Methanol-water (17:3)		Water-methanol-acetic acid (15:4:1)	
	Recovery to designed value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery to designed value (%)	RSD (%)	Recovery to designed value (%)	RSD (%)	Recovery to designed value (%)	RSD (%)
For growing pig	101	1.2	102	1.9	89.2	3.5	97.5	0.5
For suckling pig 1	95.2	2.3	93.7	0.9	92.8	5.0	95.9	4.1
For suckling pig 2	102	0.5	101	0.5	104	5.8	100	0.2
For suckling pig 3	95.3	2.1	94.1	1.1	87.2	4.2	93.0	1.6

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

2) 抽出操作時の温度条件の比較

加熱試料について、抽出溶媒として、旧法の抽出溶媒であるメタノール-水 (17+3) 及び比較のため、現行法の抽出溶媒である水-メタノール-酢酸 (15+4+1) を用いて、抽出操作時に温度条件を変更し、以下旧法に従って定量を行い、抽出溶媒及び抽出操作時の温度条件の違いによる定量値の比較を行った。

まず、分析試料を量って褐色共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒を加えたのち、密栓した。次に、密栓した褐色共栓三角フラスコを、10 °C に設定した水中及び 40 °C に設定したウォーターバス中に防水スターラーを入れて、30 分間かき混ぜて抽出したのち、以下旧法に従って定量を行った。その結果、Table 4 のとおり、抽出溶媒に水-メタノール-酢酸 (15+4+1) を用いると、抽出時の温度によって定量値が変化しなかったのに対し、抽出溶媒にメタノール-水 (17+3) を用いると 10 °C では定量値が低かったが、40 °C では定量値が向上し、加熱処理による抽出効率の低下が改善された。また、抽出溶媒にメタノール-水 (17+3) を用いると、近接する妨害ピークが認められなかった。以上のことから、抽出溶媒としてメタノール-水 (17+3) を採用し、次に最適な抽出温度の検討をすることにした。

なお、本検討で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 4 Comparison of recovery to designed value of morantel citrate by extracting solvent and temperature

Formula feed types	Methanol-water (17:3)				Water-methanol-acetic acid (15:4:1)			
	10 °C		40 °C		10 °C		40 °C	
	Recovery to designed value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery to designed value (%)	RSD (%)	Recovery to designed value (%)	RSD (%)	Recovery to designed value (%)	RSD (%)
For growing pig	66.6	0.3	104	0.6	101	1.0	101	0.8
For suckling pig 1	87.0	2.3	101	1.6	93.6	1.3	95.7	4.8
For suckling pig 2	88.6	3.3	103	1.8	100	0.5	101	0.9
For suckling pig 3	70.0	0.9	98.8	0.6	94.1	1.2	93.4	1.3

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

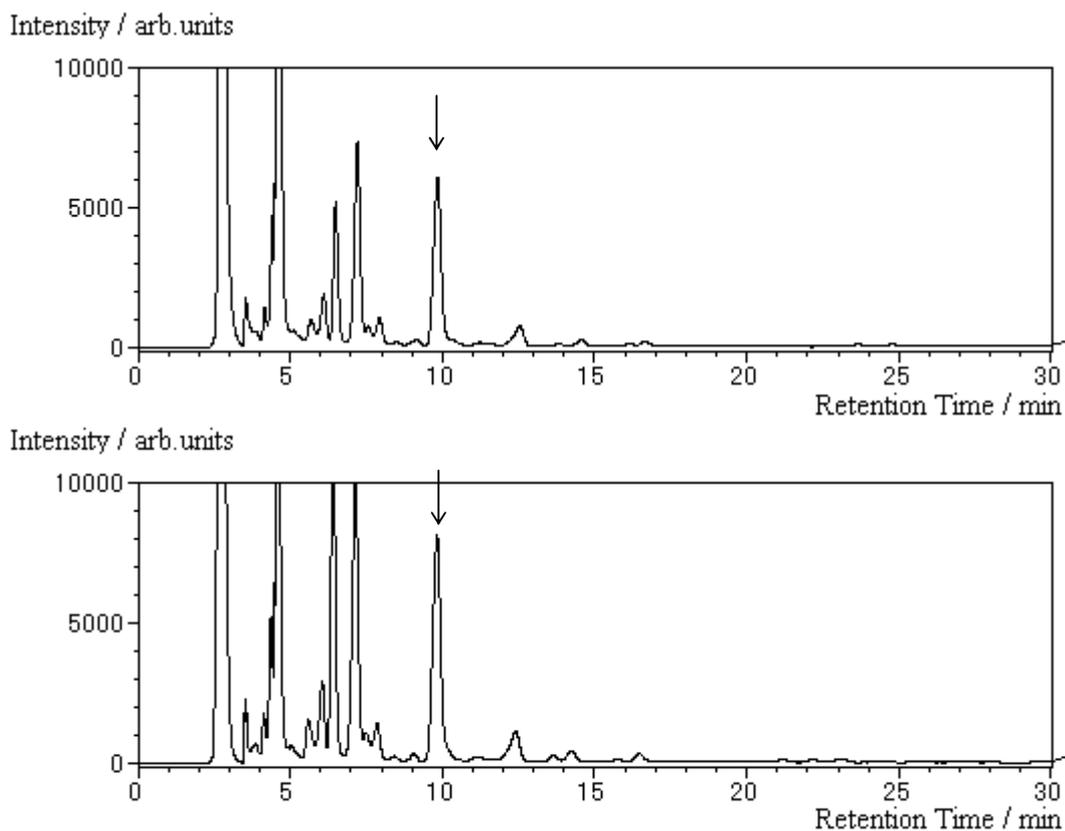


Fig. 4 LC chromatograms of sample solutions

LC conditions are shown in Table 2.

(Upper) Sample solution by extracting at 10 °C (Extracting solvent: methanol-water (17:3))

(Lower) Sample solution by extracting at 40 °C (Extracting solvent: methanol-water (17:3))

(Arrows indicate the peak of morantel citrate.)

3.3 抽出温度の検討

抽出時の温度による抽出効率を調べるため、クエン酸モランテルを含有している加熱試料（ほ

乳期子豚育成用) 5 種類及びその同一製造ロット加熱処理前の非加熱試料を用いて検討を行った。

まず、分析試料 10.0 g を量って褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水 (17+3) を加えた後、密栓した。次に、密栓した褐色共栓三角フラスコを、10, 20, 30, 40 及び 50 °C に保持したウォーターバス中に防水スターラーを入れて、30 分間かき混ぜて抽出したのち、以下本法に従って定量を行った。その結果、Fig. 5 のとおり、非加熱試料については抽出温度による定量値への影響は見られなかったのに対し、加熱試料については、いずれも抽出温度の上昇に伴い抽出効率の改善がみられ、40 °C で、ほぼ表示量に対する割合が一定に近くなっており、40 °C 以上では顕著な変化は認められなかった。

以上の結果から、非加熱試料については抽出温度による定量値への影響が見られなかったため常温で抽出することにした。加熱試料については、操作性及び安全性を考慮して、必要十分と考えられた 40 °C で抽出を行うことにした。

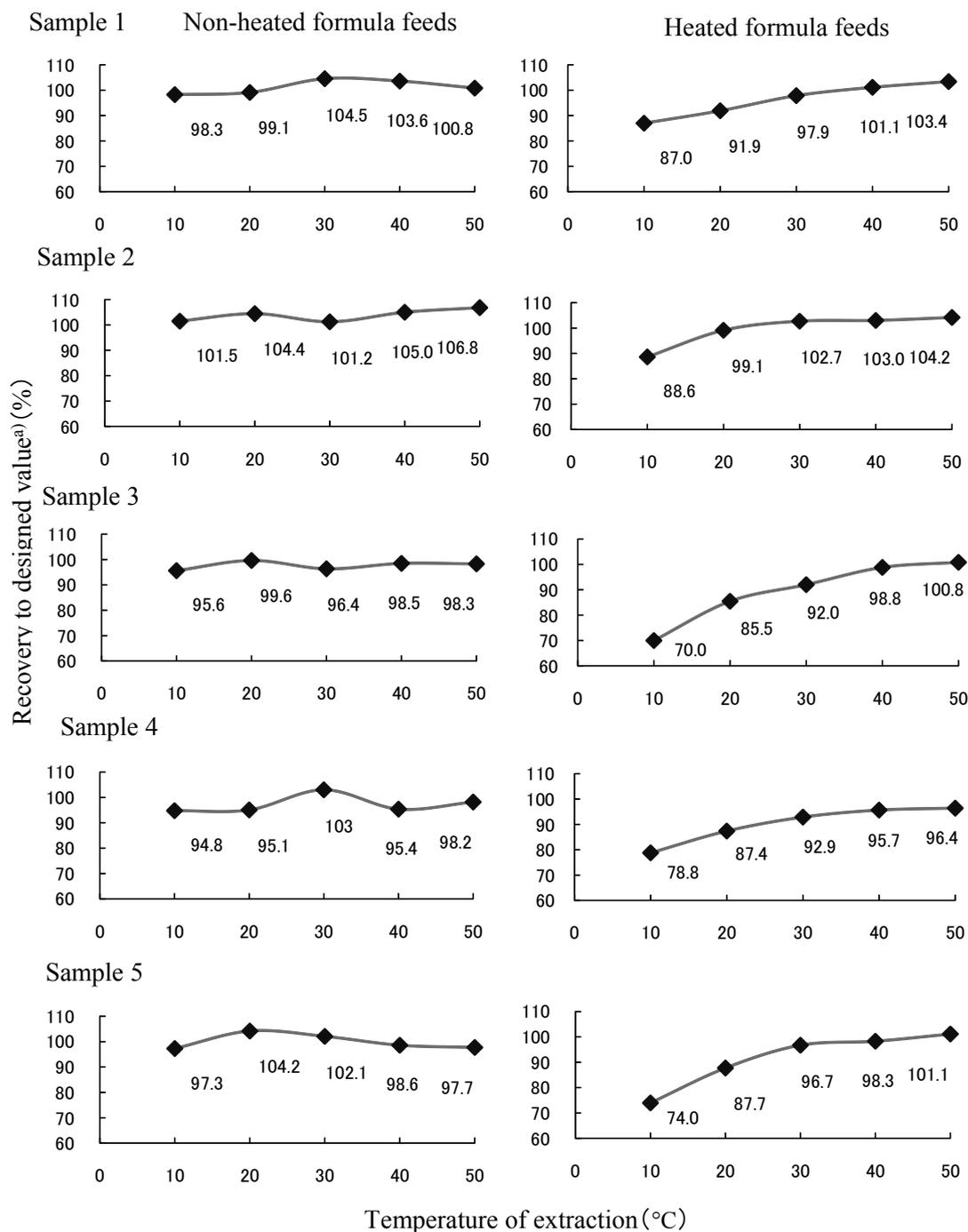


Fig. 5 Comparison of recovery to designed value of morantel citrate by temperature of extraction sample 1~5

(Non-heated formula feeds (left) and heated formula feeds (right))

LC conditions are shown in Table 2.

a) Mean ($n=3$)

3.4 カラム処理の検討

塩基性アルミナを用いたカラム処理の流出液の画分の確認を行った。

クエン酸モランテルを 30 g/t 含有するほ乳期子豚育成用加熱試料及びその同一製造ロット加熱処理前の非加熱試料を用い、2.4 の 1)により抽出した。その後、2.4 の 2)の塩基性アルミナのカラム処理に供し、その流出液を 2 mL ずつ 5 分画して各画分を液体クロマトグラフに注入し、クエン酸モランテル量を定量した。

その結果、Table 5 のとおりクエン酸モランテルは初めの 0~4 mL までの画分はその後の画分には比が高い定量値を示し、4 mL 以後は比較的安定した。これは旧法の基となった千原ら⁴⁾及び松村ら⁵⁾の報告と同様の傾向であることから、本法でも旧法を変更せずに初流の 5 mL を捨て、その後の 5 mL を試料溶液として用いることとした。

Table 5 Effluent pattern of morantel citrate from basic alumina column

Recovery to designed value ^{a)}	Fraction volume (mL)					
	0~2	~4	~6	~8	~10	~12
Before expander processing (%)	110	103	100	100	98.6	100
After expander processing (%)	106	102	98.8	97.2	99.9	96.7

a) Mean (n=3)

3.5 クエン酸モランテルの温度による影響について

本法では抽出時に 40 °C で 30 分間加温することから、クエン酸モランテルの温度による安定性を、抗菌性物質を含まない配合飼料から調製した空試験液を用いて、夾雑成分共存下で確認した。2.2 の 1)に従い、1 mL 中に 3 µg を含有するクエン酸モランテル標準液を調製し、褐色のガラス試験管に正確に 1 mL 入れ、50 °C 以下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。2.4 の 1) 及び 2)に従って抗菌性物質を含まない市販の配合飼料（ほ乳期子豚育成用）から調製した試料溶液のうち、その 1 mL を、前述の標準液を乾固した後の褐色のガラス試験管に正確に加えて残留物を溶かし、密栓した。その後、40 °C に設定したウォーターバス中で、遮光条件下で 0, 4, 8 及び 24 時間静置した後の試料溶液を液体クロマトグラフに注入して、経時変化を調べた。その結果、Table 6 のとおり、40 °C 条件下で 24 時間経過後でもクエン酸モランテルの濃度の低下は認められなかった。

Table 6 Stability for morantel citrate at 40 °C

	Elapsed time at 40 °C (hour)			
	0	4	8	24
Concentration ^{a)} (%)	102	102	103	102

a) n=2

3.6 妨害物質の検討

現在、クエン酸モランテル以外に飼料添加物に指定されている抗菌性物質は、抗生物質で 18 種類及び合成抗菌剤で 6 種類あり、このうち、クエン酸モランテルとの併用が認められているものは 12 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、セデカマイシン、ノシヘプタイド、バージニアマイシン、ピコザマイシン、フラボフォスフォリポール、硫酸コリスチン及びリン酸タイロシン) がある。これらは、既に本法と液体クロマトグラフィーの測定条件が同一である松村ら⁵⁾の報告において、クエン酸モランテルの定量を妨げるピークは認められないことが確認されている。

次に、クエン酸モランテルの添加が可能である市販の配合飼料（ほ乳期子豚育成用 4 種類及び子豚育成用 4 種類）を用い、本法に従って（抽出温度については 40 °C で行った）調製した試料溶液を液体クロマトグラフに注入し、妨害ピークの有無を確認したところ、定量を妨げるピークは認められなかった。

また、クエン酸モランテルの添加が可能である市販の配合飼料（ほ乳期子豚育成用 1 種類）を用いて、抽出温度以外を本法に従い、抽出温度については 50 °C で抽出操作を行って調製した試料を、液体クロマトグラフに注入し、妨害ピークの有無を確認したところ、40 °C で抽出操作を行った場合と同様に定量を妨げるピークは認められなかった。このことから、加温により定量を妨害する夾雑ピークが出るようなことはないと考えられた。

なお、妨害物質の検討で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 6 に示した。

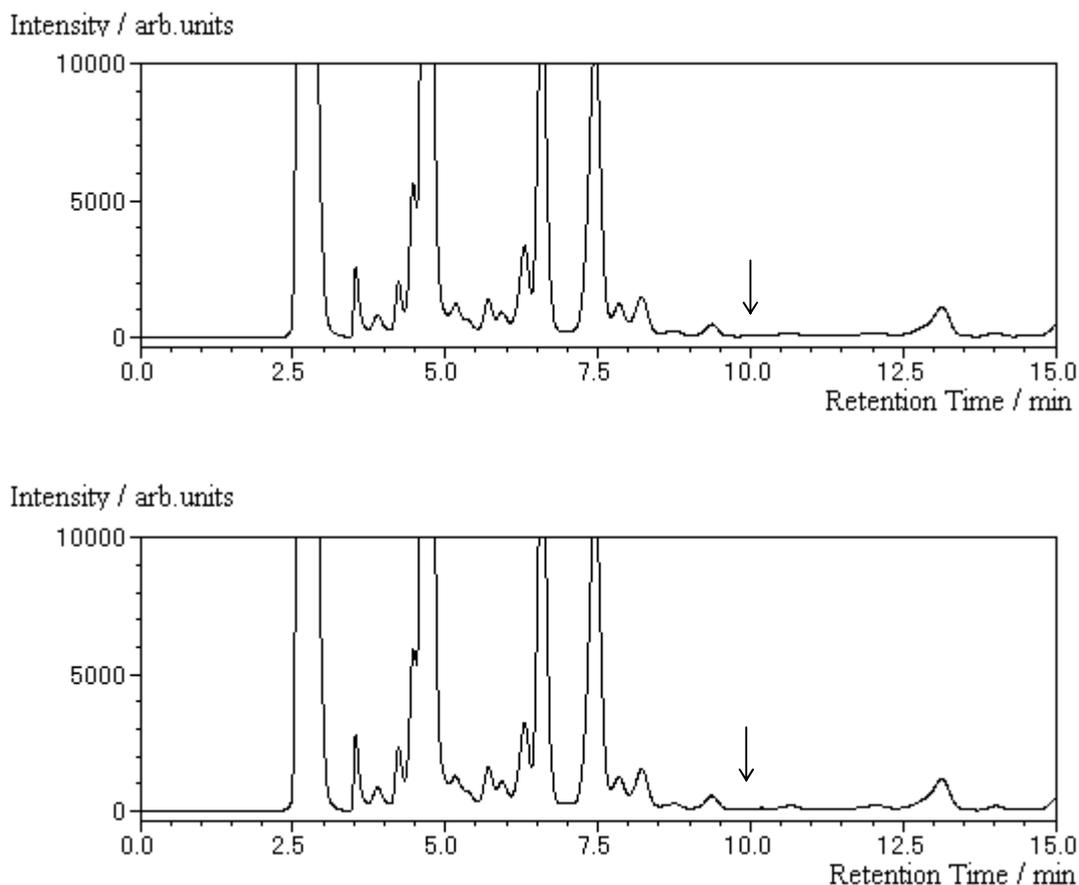


Fig. 6 LC chromatograms of blank solutions

LC conditions are shown in Table 2. (Arrows indicate the peak of morantel citrate.)
(Upper) Sample solution of formula feed for suckling pig by extracting at 40 °C (not spiked)
(Lower) Sample solution of formula feed for suckling pig by extracting at 50 °C (not spiked)

3.7 加熱処理された配合飼料への分析法適用の検討

加熱処理された配合飼料への本法の適用を確認するため、クエン酸モランテルを 30 g/t を含有する市販の加熱試料（ほ乳期子豚育成用）及びその同一製造ロット加熱処理前の非加熱試料各 5 種類について、本法により 3 点併行で定量し、その表示に対する定量値の割合及び繰返し精度（RSD）をもとめ、比較試験を実施した。

なお、加熱加工形態として、ペレット加工（粉状の飼料をペレットミルによって、加圧して蒸気を吹き込みながらダイを通して押し出して短い円柱状に成型する）、クランブル加工（ペレットを粗くくたく）及びエキスパンダー加工（飼料を円筒の中に入れ、蒸気と圧力を加え、大気中に放出することで、急激な膨潤を起こさせ、飼料を膨化させる）した飼料を使用した。

その結果、Table 7 のとおり、各同一製造ロットの試料における加熱処理の前後において、定量値及びその繰返し精度に特に差異は認められなかった。

このことから、本法において、加熱処理の有無は定量値に影響を与えないことが明らかになった。

Table 7 Comparison of recovery to designed value of morantel citrate by before and after heat treatment process sample

Type of heat treatment process	Before heat treatment process		After heat treatment process	
	Recovery to designed value ^{a),c)}	RSD ^{b)}	Recovery to designed value ^{a),d)}	RSD ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)
Expander pellet crumble 1	95.2	2.3	101	1.6
Expander pellet crumble 2	102	0.5	103	1.8
Expander pellet crumble 3	95.3	2.1	98.8	0.6
Expander pellet crumble 4	99.5	4.6	98.3	1.4
Pellet crumble	97.1	3.3	95.7	0.3

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Extract at room temperature

d) Extract at 40 °C

3.8 添加回収試験

試料として、非加熱試料については、2.1 で調製したクエン酸モランテルとして 15, 30 及び 45 g/t を含有する配合飼料を用いて、加熱試料については当方で任意の濃度のクエン酸モランテルを含有した配合飼料を製造もしくは入手することが困難であることから、クエン酸モランテルとして 30 g/t を含有する市販の配合飼料をもちいて、本法により 3 点併行で定量し、回収率（加熱試料については表示量に対する割合）及び繰返し精度を検討した。

その結果は、Table 8 及び 9 のとおり、非加熱試料についてはクエン酸モランテルの平均回収率は 90.3~103 %、その繰返し精度は、相対標準偏差（RSD）として 4.6 %以下、加熱試料についてはクエン酸モランテルの表示に対する割合は 95.7~103 %、その繰返し精度は、相対標準偏差（RSD）として 2.4 %以下の成績が得られた。添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 7 に示した。

Table 8 Recoveries of morantel citrate from mash formula feeds

Spiked level (g/ton)	Formula feed types					
	For growing pig 1		For growing pig 2		For growing pig 3	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
15	98.6	3.6	95.7	2.4	96.6	4.6
30	102	3.2	95.7	0.5	99.6	3.7
45	90.3	2.9	103	3.0	101	0.3

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 9 Recoveries of morantel citrate from heat treated formula feeds

Type of heat treatment process	Designed value : 30 (g/ton)	
	Recovery to designed value ^{a)}	RSD ^{b)}
	(%)	(%)
Expander pellet crumble 1	101	1.6
Expander pellet crumble 2	103	1.8
Expander pellet crumble 3	98.8	0.6
Expander pellet crumble 4	98.3	1.4
Pellet crumble	95.7	0.3
Pellet	101	2.4

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

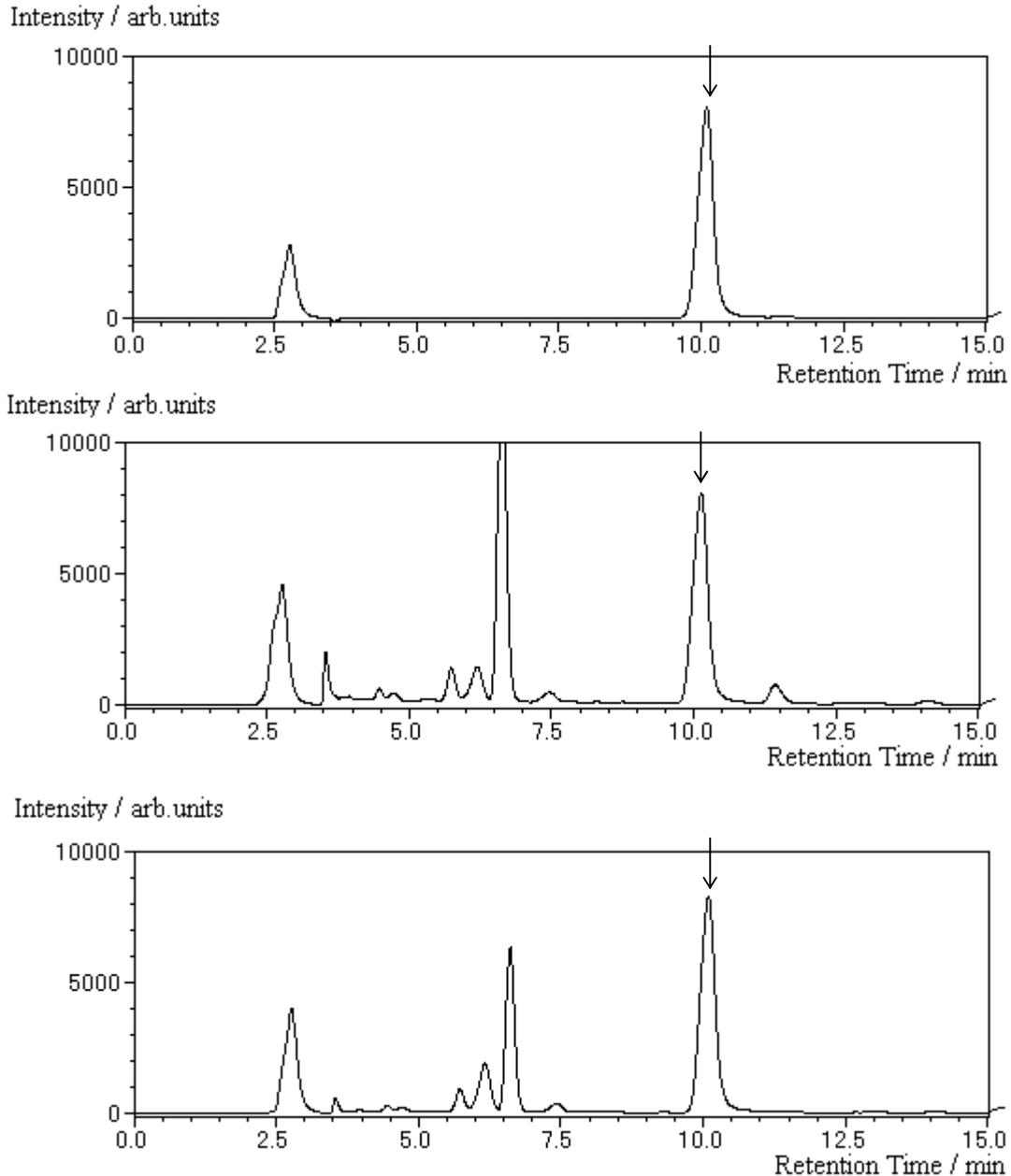


Fig. 7 Chromatograms of morantel citrate

(Upper) Standard solution (The amount of morantel citrate is 60 ng.)

(Middle) Sample solution of formula feed designed at 30 g/ton (Crumble)

(Lower) Sample solution of formula feed spiked at 30 g/ton (Mash)

(Arrows indicate the peak of morantel citrate.)

3.9 現行法との比較

本法及び現行法の試験成績を比較するため、3種類のクエン酸モランテルを含有する市販配合飼料について、添加された表示量(30 g/t)に対する割合を本法及び現行法により定量し求めた。

また、2.1で調製したクエン酸モランテルとして30 g/tを含有する配合飼料1種類を用いて、本法及び現行法により添加回収試験を実施した。

その結果、Table 10 のとおり、定量値の改善が認められた。

Table 10 Comparison of recovery to designed value of morantel citrate by the existing and this method

Formula feed types	Shape of feed	This method			Existing method		
		Recovery to designed value ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery to designed value ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
For suckling pig 1	pellet	101		2.4	86.0		1.8
For suckling pig 2	mash	94.9		2.2	85.9		2.0
For growing pig 1	crumble	94.6		0.9	84.9		3.7
For growing pig 2	mash		99.6	3.7		87.7	2.3

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.10 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

非加熱試料（子豚育成用配合飼料 2 種類）及び加熱試料（ほ乳期子豚育成用配合飼料 1 種類）を用い、非加熱試料については、抗菌性物質を含まない市販の配合飼料（子豚育成用配合飼料）を 1 mm の網ふるいを通すまで粉砕したのち、クエン酸モランテルを含有する複合製剤を添加し、クエン酸モランテルを 30 g/t 含有する試料を調製した。加熱試料については、市販のクエン酸モランテルの表示量が 30 g/t である配合飼料を用い、1 mm の網ふるいを通すまで粉砕して調製した。

均質性の確認については、作成した試料が 50 袋未満であったため、ランダムに抜き取った 5 袋の併行分析を実施した。その結果、非加熱試料 1 では、平均回収率は 99.5 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 2.7 %、非加熱試料 2 では、平均回収率は 102 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 2.3 %、加熱試料では、表示に対する割合は 95.4 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 0.7 % であり、試料袋間の均質性に特に問題は認められなかった。

調製したクエン酸モランテルを 30 g/t 含有する非加熱試料（子豚育成用配合飼料）2 種類及びクエン酸モランテルの表示量が 30 g/t である加熱試料（ほ乳期子豚育成用配合飼料）1 種類を用いて、JA 東日本くみあい飼料株式会社、協同飼料株式会社研究所、財団法人日本食品分析センター彩都研究所、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センター（計 9 試験室）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 11 のとおりであり、非加熱試料 1 では平均回収率は 102 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 3.5 % 及び 3.0 % であり、HorRat は 0.31 であった。非加熱試料 2 では、平均回収率は 102 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 2.8 % 及び 3.5 % であり、HorRat は 0.37 であった。加熱試料では、表示量に対する割合は 96.4 %、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1.0%及び2.3%であり、HorRatは0.24であった。

参考のため、各試験室で使用した液体クロマトグラフの機種等をTable 12に示した。

Table 11 Collaborative study results of morantel citrate

Lab. No.	Feed types					
	Non-heated feed		Non-heated feed		Heated feed	
	Formula feed for growing pig 1 (g/t)	Formula feed for growing pig 1 (g/t)	Formula feed for growing pig 2 (g/t)	Formula feed for growing pig 2 (g/t)	Formula feed for suckling pig (g/t)	Formula feed for suckling pig (g/t)
1	30.8	30.4	29.9	31.3	27.7	28.0
2	30.3	30.9	29.6	29.0	30.1	29.5
3	30.2	30.2	29.0	29.7	28.3	28.4
4	30.4	30.0	31.4	29.8	29.0 ^{e)}	30.9 ^{e)}
5	29.8	30.0	29.7	30.3	28.8	28.6
6	30.0	32.6	33.0	31.1	29.5	29.4
7	30.1	29.4	29.8	30.3	29.5	29.0
8	29.4	32.8	32.1	30.3	28.7	29.0
9	29.9	30.9	30.7	31.2	29.5	28.9
Spiked level (g/t)	30.0		30.0		30.0 ^{f)}	
Mean value ^{a)} (g/t)	30.5		30.5		28.9	
Recovery ^{a)} (%)	102		102		96.4 ^{g)}	
RSD _r ^{b)} (%)	3.5		2.8		1.0	
RSD _R ^{c)} (%)	3.0		3.5		2.3	
PRSD _R ^{d)} (%)	10		10		10	
HorRat	0.31		0.37		0.24	

a) Non-heated feeds: $n=18$, Heated feed: $n=16$ (without Lab No.4)

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

e) Data excluded by Cochran Test

f) Designed value

g) Recovery to designed value

Table 12 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	Instrument	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Agilent Technologies Agilent 1100 Series	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (4.6×250 mm, 5 μm)
2	Agilent Technologies Agilent 1100 Series	Showa Denko Shodex C18M4E (4.6×250 mm, 5 μm)
3	Agilent Technologies Agilent 1100 Series	Showa Denko Shodex C18M4E (4.6×250 mm, 5 μm)
4	Waters Waters2487	Showa Denko Shodex C18M4E (4.6×250 mm, 5 μm)
5	Shimadzu Prominence	Showa Denko Shodex C18M4E (4.6×250 mm, 5 μm)
6	Shimadzu Prominence	Shiseido CAPCEL PAK C18 (4.6×250 mm, 5 μm)
7	Shimadzu Prominence	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (4.6×250 mm, 5 μm)
8	JASCO JASCO X-LC 3185PU	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (4.6×250 mm, 5 μm)
9	Agilent Technologies Agilent 1100 Series	GL Sciences Inertsil ODS-3 (4.6×250 mm, 5 μm)

4 まとめ

旧法を基に、配合飼料中のクエン酸モランテルの液体クロマトグラフによる定量法の改良を検討したところ、次の結果が得られた。

- 1) 検量線は 0.1~5.0 μg/mL (注入量として 2~100 ng) の範囲で直線性を示した。
- 2) 抽出溶媒としてメタノール-水 (17+3) を用い、非加熱試料については常温で、加熱試料については 40 °C で 30 分間抽出を行うことにより良好な測定が可能であった。
- 3) 配合飼料 8 種類について、本法に従って調製した試料溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムから、妨害物質の有無を確認したところ、妨害物質は認められなかった。
- 4) クエン酸モランテルを含有する市販の配合飼料について、その同一製造ロットの試料における加熱処理の前後において、定量値及びその繰返し精度に特に差異は認められなかった。
- 5) 非加熱試料についてはクエン酸モランテルの平均回収率は 90.3~103 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 4.6 %以下、加熱試料についてはクエン酸モランテルの表示に対する割合は 95.7~103 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 2.4 %以下の成績が得られた。
- 6) クエン酸モランテルを 30 g/t 含有する非加熱試料 (子豚育成用配合飼料) 2 種類及びクエン酸モランテルの表示量が 30 g/t である加熱試料 (ほ乳期子豚育成用配合飼料) 1 種類を用いて、9 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、非加熱試料 1 では平均回収率は 102 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 3.5 % 及び 3.0 % であり、HorRat は 0.31 であった。非加熱試料 2 では、平均回収率は 102 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 2.8 % 及び 3.5 % であり、HorRat

は 0.37 であった。加熱試料では、表示量に対する割合は 96.4%，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 1.0% 及び 2.3% であり、HorRat は 0.24 であった。

謝 辞

本検討におきまして、ご協力いただきました JA 東日本くみあい飼料株式会社の各位に感謝の意を表します。

また、検討用飼料を提供していただいた JA 東日本くみあい飼料株式会社、日清丸紅飼料株式会社、豊橋飼料株式会社、鹿島飼料株式会社、コーキン化学株式会社、中部飼料株式会社、日本農産工業株式会社、西日本飼料株式会社の各位に感謝の意を表します。

更に、共同試験に参加していただいた JA 東日本くみあい飼料株式会社、協同飼料株式会社研究所、財団法人日本食品分析センター彩都研究所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く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) 石黒瑛一：高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のクエン酸モランテルの定量法，飼料研究報告，11，75-85 (1986).
- 4) 千原哲夫，堀切正賀寿：高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のクエン酸モランテルの定量法，飼料研究報告，19，73-87 (1994).
- 5) 松村惣一郎，福本裕二，鬼頭敦司，小野雄造，千原哲夫：高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のクエン酸モランテルの定量，飼料研究報告，22，77-86 (1997).
- 6) 山本克己：高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のクエン酸モランテルの定量法の改良，飼料研究報告，31，98-108 (2006).
- 7) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 8) 千原哲夫，松村惣一郎，橋本亮，堀切正賀寿：高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の低濃度クエン酸モランテルの定量法，飼料研究報告，18，68-79 (1993).

3 飼料中の動物由来 DNA 検出法における RFLP を用いた確認試験法

橋本 仁康^{*1}, 篠田 直樹^{*2}

PCR-RFLP Identification of Prohibited Animal-derived DNA in Animal Feeds

Yoshiyasu HASHIMOTO^{*1} and Naoki SHINODA^{*2}

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

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

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

In Feed Analysis Standards detection of prohibited animal-derived proteins by PCR is determined only by amplicon size. However the determination of only amplicon size may make a miss judge to determine the same size that is non-specific amplicon, it is necessary to confirm whether or not the positive result is due to a non-specific reaction. DNA sequencing is the best method, but it is not suitable in routine analysis. Restriction enzymatic fragment length polymorphism (RFLP) is suitable method for identification of amplicon because it is easy and quick. A method for confirming identification of bovine tissue in animal feed has been developed on the basis of PCR-RFLP analysis in this study. Amplicon by mammal-specific primers was identified by restriction enzyme; *Sml*I and *Mbo*I. Amplicon by ruminant-specific primers was identified by *Bln*I. Amplicon by cattle-specific primers was identified by *Hpy*188III. This PCR-RFLP method, which ensures identification of prohibited animal species in feed, is useful for enhancing the reliability of feed inspection for BSE prevention.

Key words: feed ; animal-derived DNA ; animal protein ; restriction enzyme ; RFLP ; PCR

キーワード：飼料；動物由来 DNA；動物由来たん白質；制限酵素；制限酵素断片長多型；ポリメラーゼ連鎖反応

1 緒 言

日本において牛海綿状脳症（BSE）の感染が確認されたことから、感染の拡大防止のために、反すう動物用飼料を除く家畜用飼料への動物由来たん白質の利用が制限されている。肉骨粉等の反すう動物由来たん白質の家畜用飼料への利用をはじめ、牛用飼料への動物由来たん白質の利用は、原則として禁止されている¹⁾。

現在、飼料分析基準では、飼料中の動物由来たん白質や動物由来 DNA の検出法として、顕微鏡鑑定法、ELISA 法及び PCR 法の 3 つの方法が規定されている²⁾。

PCR 法による動物由来 DNA の検出は、混入を確認したい動物由来たん白質遺伝子に対応するプライマーを用いて、PCR 反応を行い、規定されている増幅産物の大きさに混入の有無を判定してい

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

る。こうした増幅産物の同定は、一般的にシーケンスによる塩基配列の確認を行っているが、日常的検査においては実行上困難である。増幅産物の大きさによる判定は、非特異反応によって同一サイズの増幅産物が生成されている可能性も否定できない。

そこで、今回 PCR 増幅産物の制限酵素切断によって、増幅産物の同定を行うことにより RFLP 法 (Restriction Fragment Length Polymorphism) を用いた迅速で簡便な PCR 反応の確認試験^{3),4)}の検討を行ったので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

1) TAE (tris-acetate, EDTA) 緩衝液

50×TAE (ニッポンジーン製) 20 mL を水で希釈して 1,000 mL とした。

2) 2.5 %アガロースゲル

Agarose L03「TaKaRa」(タカラバイオ製) 2.5 g を TAE 緩衝液 100 mL に加え、加熱して溶かし、ゲルの厚さが 3~4 mm になるようゲル成型に流し込み、ゲルとコームの間に気泡が入らないよう慎重にコームを差し込み、室温に放置して固化させた。

3) 5 %アガロースゲル

Agarose L03「TaKaRa」(タカラバイオ製) 5 g を TAE 緩衝液 100 mL に加え、加熱して溶かし、ゲルの厚さが 3~4 mm になるようゲル成型に流し込み、ゲルとコームの間に気泡が入らないよう慎重にコームを差し込み、室温に放置して固化させた。

4) 電気泳動用色素溶液

6×Lording dye (タカラバイオ製)

5) ゲル染色液

臭化エチジウム 10 mg を滅菌した水 1,000 μ L に溶かして臭化エチジウム原液を調製し、使用時にこの原液 50 μ L に TAE 緩衝液 1,000 mL を加えて染色液とした。

6) PCR 反应用酵素 AmpliTaq Gold (Applied Biosystems 製)

7) PCR 緩衝液 10×PCR Gold buffer (Applied Biosystems 製)

8) 2 mmol/L dNTP Mix (Applied Biosystems 製)

9) 25 mmol/L 塩化マグネシウム (Applied Biosystems 製)

10) プライマー溶液 ほ乳動物検出用プライマー対 (2 μ mol/L), 反すう動物検出用プライマー対 (2 μ mol/L), 牛検出用プライマー対 (2 μ mol/L) (いずれも BEX 製)

11) 陽性対照 牛ミトコンドリア DNA (BEX 製)

12) PCR 反応液

水 4.7 μ L, PCR 緩衝液 2.0 μ L, 2 mmol/L dNTP Mix 2.0 μ L, 25 mmol/L 塩化マグネシウム 1.2 μ L, 2 μ mol/L 5'プライマー溶液 4.0 μ L, 2 μ mol/L 3'プライマー溶液 4.0 μ L 及び PCR 反应用酵素 0.1 μ L (0.5 unit) を PCR チューブ 1 本あたりの必要量として、それぞれ必要本数分の量を量って順次マイクロチューブ (容量 1.5 ml) に加えて、振り混ぜ調製した。

13) DNA 分子量マーカー

100 bp Ladder (100~1,500 bp (base pair)) 及び 20 bp Ladder (20~1,000 bp) (タカラバイオ製) を使用した。

- 14) 水 滅菌超純水（高圧蒸気滅菌（121 °C, 15 分間）した超純水（電気伝導率 5.6 $\mu\text{S}/\text{m}$ 以下（比抵抗 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上））
- 15) 制限酵素
ほ乳動物検出用プライマー増幅産物用：*Sml*I, (New England Biolab 製), *Mbo*I (タカラバイオ製)
反すう動物検出用プライマー増幅産物用：*Bln*I (タカラバイオ製)
牛検出用プライマー増幅産物用：*Hpy*188III (New England Biolab 製)

2.2 装置及び器具

- 1) DNA 増幅装置：Applied Biosystems 製 PE9700 型
- 2) 電気泳動装置：アドバンス製 Mupid2
- 3) 電気泳動パターン撮影システム：アトー製 AE-6911CX

2.3 試験方法

- 1) PCR 反応
 - i) PCR 反応液 18 μL を PCR チューブ（容量 200 μL ）に入れ，DNA 試料液 2.0 μL を加えて混合し，PCR 反応に供する試料溶液とした。
同時に，陽性対照 2.0 μL をあらかじめ PCR 反応液 18 μL を入れたそれぞれ別の PCR チューブに加えて同様に操作し，陽性対照液を調製した．また，水 2.0 μL をあらかじめ PCR 反応液 18 μL を入れたそれぞれ別の PCR チューブに加えて同様に操作し，陰性対照液を調製した．
 - ii) 試料溶液，陽性対照液及び陰性対照液の入った PCR チューブを DNA 増幅装置に入れ，95 °C（9 min 保持）→ [92 °C（30 s 保持）→55 °C（30 s 保持）→72 °C（30 s 保持）]（45 サイクル）→72 °C（5 min 保持）で PCR 反応を行った．
- 2) 電気泳動
 - i) TAE 緩衝液を入れた泳動槽に 2.5 %アガロースゲルを入れ，10 分間 100 V の定電圧をかけて予備泳動をした．
 - ii) PCR 反応の終了した反応液 5 μL に約 1 μL の電気泳動用色素溶液を加えて混合し，その全量をアガロースゲルのウェルに注入した．
 - iii) DNA 分子量マーカーは，100 bp Ladder または 20 bp Ladder 2.5 μL に約 1/5 量の電気泳動用色素溶液を加えて混合し，その全量をアガロースゲルのウェルに注入した．
 - iv) 100 V の定電圧をかけ，ブロモフェノールブルーがウェルから 3~4 cm 移動するまで約 20 分間電気泳動を行った．
 - v) 電気泳動の終了したアガロースゲルをゲル染色液に約 30 分間浸して染色した．
 - vi) 電気泳動パターン撮影システムでアガロースゲルに 312 nm の紫外線を照射し，DNA 分子量マーカーのバンド位置と比較して DNA 断片サイズを決定した．
- 3) PCR 反応による増幅の判定
陽性対照 DNA の PCR 増幅産物と同一サイズの PCR 増幅産物が検出されたことを確認し，検出された PCR 増幅反応液を次の制限酵素反応に供する増幅反応液とした．

4) 制限酵素反応

- i) 増幅反応液 9 μL 及び各プライマー増幅産物に対応する各制限酵素 (Table 1) 1 μL を PCR チューブ (容量 200 μL) に加えた.
- ii) i) を DNA 増幅装置に入れ, 37 $^{\circ}\text{C}$ (*SmlI* のみ 55 $^{\circ}\text{C}$) で 1 時間反応させた.

5) 電気泳動

- i) TAE 緩衝液を入れた泳動槽に 5 % アガロースゲルを入れ, 10 分間 100 V の定電圧をかけて予備泳動をした.
- ii) DNA 分子量マーカーは, 100 bp Ladder, 50 bp Ladder または 20 bp Ladder 2.5 μL に約 1/5 量の電気泳動用色素溶液を加えて混合し, その全量をアガロースゲルのウェルに注入した.
- iii) 制限酵素反応の終了した反応液及び制限酵素反応を行っていない増幅反応液 5 μL に約 1 μL の電気泳動用色素溶液を加えて混合し, その全量をアガロースゲルのウェルに注入した.
- iv) 100 V の定電圧をかけ, ブロモフェノールブルーがウェルから, 5~6 cm 移動するまで約 50 分間電気泳動を行った.
- v) 電気泳動の終了したアガロースゲルをゲル染色液に約 30 分間浸して染色した.
- vi) 電気泳動パターン撮影システムでアガロースゲルに 312 nm の紫外線を照射し, DNA 分子量マーカーのバンド位置と比較して DNA 断片サイズを決定し, データベースで確認した断片と同等の断片が検出されているかを確認した.

3 結果及び考察

3.1 特異性の検討

ウシ, ブタ, ヒツジ, ヤギ, シカ, ウマ, ウサギ, マウス, ラット及びクジラのミトコンドリア DNA (以下「mtDNA」という.) について, 各プライマーで増幅される配列を Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) より検索し, CLUSTAL W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) で比較し, MIKENORA RESEARCH version 4.0 (第一化学薬品工業) を用いて適切な制限酵素を検索した. 各制限酵素で切断される増幅断片のサイズは, Table 1 に示した.

Table 1 Predicted fragment sizes of the sequences to be amplified by each primer set based on sequence map analysis

primer	restriction enzyme	template DNA	undigested PCR product size (bp)	digested PCR product size (bp)
mammals	<i>Sml</i> I	cattle, deer, sheep, horse, pig, rat, mouse	176	142, 34
		goat	173	139, 34
		rabbit	176	117, 59
		whale	176	-
	<i>Mbo</i> I	cattle	176	148, 28
		deer, sheep, goat, horse, pig, rat, mouse, rabbit, whale	176	-
ruminants	<i>Bln</i> I	cattle, deer, sheep, goat	201	116, 85
cattle	<i>Hpy</i> 188III	cattle	126	58, 47, 21

同時に、PCR 反応を行い、増幅反応が認められたものに関してそれぞれ実際に制限酵素処理を行い、反応性を調べた (Fig.1~4).

Fig. 1 は、ほ乳動物検出用プライマー対で増幅した PCR 産物に対する *Sml*I の切断像である。A は未処理、B は *Sml*I にて 55 °C、1 時間処理をしたものである。ウシ、シカ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、ラット及びマウス mtDNA 由来の PCR 産物について同様の切断が確認され、Table 1 に示された配列より検索して想定される断片サイズと一致した。一方、ウサギ mtDNA については、他の動物種と切断像が異なるが、こちらも想定されたサイズの断片長であった。クジラ mtDNA については、配列からの想定通り切断は認められなかった。

Fig.2 は、ほ乳動物検出用プライマー対に対する *Mbo*I の切断像である。A は未処理、B は *Mbo*I にて 37 °C、1 時間処理をしたものである。ウシでは切断が確認され、配列より検索して想定される断片サイズと一致した。シカ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、マウス、ウサギ及びクジラ mtDNA 由来の PCR 産物については、配列からの想定通り切断されなかった。

Fig.3 は、反すう動物検出用プライマー対に対する *Bln*I の切断像である。A は未処理、B は *Bln*I にて 37 °C、1 時間処理をしたものである。ウシ、シカ、ヒツジ及びヤギ mtDNA 由来の PCR 産物について同様の切断が確認され、これは配列より検索して想定される断片サイズと一致していた。

Fig.4 は、牛検出用プライマー対に対する *Hpy*188III の切断像である。A は未処理、B は *Hpy*188III にて 37 °C、1 時間処理をしたものである。ウシ mtDNA 由来の PCR 産物で切断が確認され、これは配列より検索して想定される断片サイズと一致した。

以上のように、どの酵素においても配列より検索して想定される断片のサイズと一致した。

よって、この方法は PCR 増幅産物の同定に有用であることが示唆され、動物由来 DNA 検査の信頼性を高めることが可能であると考えられた。



Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the fragments produced by *Sma*I digestion of the PCR product generated with the mammal-specific primers.

(A): undigested PCR products, (B): digested PCR products, M: DNA size markers (100 bp ladder)



Fig.2 Agarose gel electrophoresis of the fragments produced by *Mbo*I digestion of the PCR product generated with the mammal-specific primers.

(A): undigested PCR products, (B): digested PCR products, M: DNA size markers (100 bp ladder)

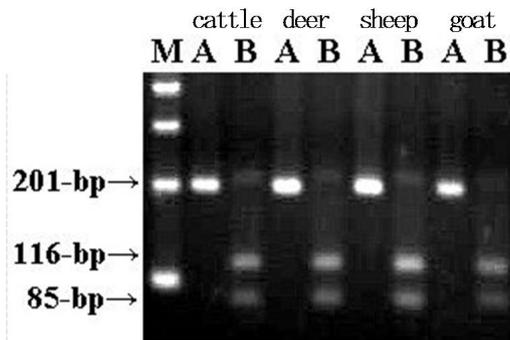


Fig.3 Agarose gel electrophoresis of the fragments produced by *Bln*I digestion of the PCR product generated with the ruminant-specific primers.

(A): undigested PCR products, (B): digested PCR products, M: DNA size markers (100 bp ladder)

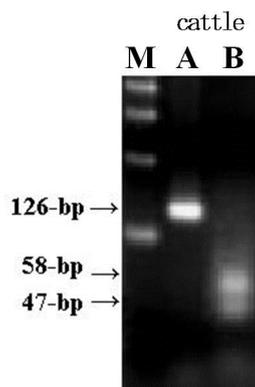


Fig.4 Agarose gel electrophoresis of the fragments produced by *Hpy188III* digestion of the PCR product generated with the cattle-specific primers.

(A): undigested PCR products, (B): digested PCR products, M: DNA size markers (100 bp ladder)

3.2 共同試験

RFLP 法による確認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。

配合飼料、豚肉骨粉及び魚粉に牛肉骨粉を 1 % 添加した試料より抽出した mtDNA 並びに豚及び羊 mtDNA (BEX 製) の計 5 種類の mtDNA を用い、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センターの 6 試験室で共同試験を実施した。

配布試料は、牛肉骨粉を 1 % 添加した配合飼料、豚肉骨粉及び魚粉については、飼料分析基準に従って抽出した mtDNA を分注し、そこからランダムに抽出した 5 サンプルについて、均質性の確認試験を行い均質性を確認した後、各試験室に配布した。豚及び羊 mtDNA については市販の陽性コントロールを分注して、同様に均質性を確認した後、各試験室に配布した。

Table 2 に示したように、全ての試験室において、PCR 増幅産物が制限酵素によって消化されると想定されるものについて、全て想定される断片サイズが得られた。また、切断されないと想定されるものについては、全て切断された断片は認められなかった。

以上の共同試験の結果から、RFLP 法を用いた確認試験法の再現性が確認された。

Table 2 Collaborative study results of PCR-RFLP

Lab. No.		mammal-specific primers									
		<i>Sml</i> I					<i>Mbo</i> I				
		1% bovine meat meal added			no bovine meat meal		1% bovine meat meal added			no bovine meat meal	
		Formula feed	Pork meal	Fish meal	pig	sheep	Formula feed	Pork meal	Fish meal	pig	sheep
1	1	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
	2	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
2	1	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
	2	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
3	1	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
	2	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
4	1	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
	2	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
5	1	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
	2	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
6	1	○	○	○	○	○	○	○	×	×	
	2	○	○	○	○	○	○	○	×	×	

Lab. No.		ruminat-specific primers					cattle-specific primers				
		<i>Bln</i> I					<i>Hpy</i> 188III				
		1% bovine meat meal added			no bovine meat meal		1% bovine meat meal added			no bovine meat meal	
		Formula feed	Pork meal	Fish meal	pig	sheep	Formula feed	Pork meal	Fish meal	pig	sheep
1	1	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
	2	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
2	1	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
	2	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
3	1	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
	2	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
4	1	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
	2	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
5	1	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
	2	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
6	1	○	○	○	-	○	○	○	-	-	
	2	○	○	○	-	○	○	○	-	-	

○ : Amplicon was detected and predicted size fragment is detected.

× : Amplicon was detected but predicted size fragment is not detected/

— : Amplicon was not detected

4 まとめ

飼料中の動物由来 DNA 検出法における RFLP を用いた確認試験について検討したところ、次の結果を得た。

- 飼料分析基準の動物由来 DNA 検出法に使用されているプライマーにより増幅される各動物種について、データベースにてその増幅産物の配列を検索し、その増幅産物を切断可能である制限酵素を検索したところ、ほ乳動物検出用プライマーについては、*Mbo*I 及び *Sml*I、反すう動物用プライマーについては、*Bln*I、牛由来 DNA 検出用プライマーについては *Hpy*188III が適用可能であった。
- データベースより検索できた制限酵素について、実際に分析を行った結果、想定とおりの結果が得られた。
- 6 試験室による共同試験を行った結果、全試験室で想定された結果と一致し、試験の再現性が確認された。
- 以上の結果から、ほ乳動物検出用プライマーの PCR 増幅産物については、制限酵素 *Mbo*I 及び *Sml*I、反すう動物用プライマーの PCR 増幅産物については、*Bln*I、牛由来 DNA 検出用プライマ

一の PCR 増幅産物については *Hpy*188III が、確認試験に適用するのに十分な精度を有していると考えられた。

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，農林水産省令第 35 号 (1976).
- 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) M. Rojas, I. Gonzalez, V. Fajardo, I. Martin, P.E. Hernandez, T. Garcia, R. Martin: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism authentication of raw meats from game birds. *J AOAC Int.*, **91**(6), 1416-1422 (2008).
- 4) C. Wolf, J. Rentsch, P. Hubner: PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *J Agric Food Chem.*, **47**(4), 1350-1355 (1999).

4 愛がん動物用飼料（ウェット製品）中の水分の測定法

石橋 隆幸*, 石田 亜希子*, 田端 麻里*

Determination of Moisture Content in Wet Type Pet Foods

Takayuki ISHIBASHI*, Akiko ISHIDA* and Mari TABATA*

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

An analytical method for determination of moisture content in wet type pet foods was developed. 10 g of the sample was placed into polyethylene film bag that contained a diatomite 2-3 g, and mixed well. The mixture was enlarged thinly in the bag, and it was dried at 105±2 °C for 3 h. After polyethylene film bag was allowed to cool to ambient temperature in the desiccators, it was weighed accurately. It was calculated loss in weight as H₂O. A measurement test of moisture content was conducted using twenty kinds of wet type pet foods. The relative standard deviations (RSD) were within 0.13 %.

Key words: moisture content ; polyethylene film bag ; pet foods ; diatomite

キーワード：水分；ポリエチレンフィルム製袋；愛がん動物用飼料；ケイソウ土

1 緒 言

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

愛がん動物用飼料は、①水分が10%程度のドライ製品、②水分が25~35%程度のセミドライ製品、③水分が70%以上のウェット製品に分類されるが、現行の愛がん動物用飼料等の検査法²⁾に収載されている水分の測定法は、ドライ及びセミドライ製品に相当する試料を適用範囲とする常圧加熱乾燥法のみであり、ウェット製品に相当する試料に適用できる方法は収載されていない。

愛がん動物用飼料中の水分の測定法としては、AOACのカールフイッシャー法によるソフトモイストペットフード中の測定法³⁾があるのみで、他は家畜用飼料中の測定法として常圧加熱乾燥法による方法⁴⁾⁻⁶⁾等があるが、水分を多く含む飼料中の測定法はない。

そこで今回、粘質状、液状及びペースト状などの食品中の水分測定法を参考にして、ウェット製品中の水分の測定法の検討を行ったので、その概要を報告する。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2.2 試薬等

- 1) ケイソウ土
ハイフラスーパーセル（和光純薬工業製）を使用した。
- 2) シリカゲル
シリカゲル，中粒状（青色）（和光純薬工業製）適量を 135 °C で 2 時間加熱乾燥し，放冷した後，デシケーター中に入れ使用した。

2.3 装置及び器具等

- 1) 電気定温乾燥機：いすゞ製作所製 SS-K-300（自然対流型）
エスペック製 PS-112（送風型）
ADVANTEC 製 DRM420DB（送風型）
ADVANTEC 製 DRM620DB（送風型）
- 2) フードプロセッサ：松下電器産業製 MK-K80
- 3) 精密天びん：島津製作所製 AW320
- 4) デシケーター：上ロコック付きで中板の直径が 18 cm のもの
- 5) ポリエチレンフィルム製袋：ハイゼックス HD ボトムシール平袋（幅 80 mm，長さ 130 mm，厚さ 0.05 mm）
- 6) 携帯型除電器：マスコット除電器（理研精工製，アズワン販売 1-8912-01）

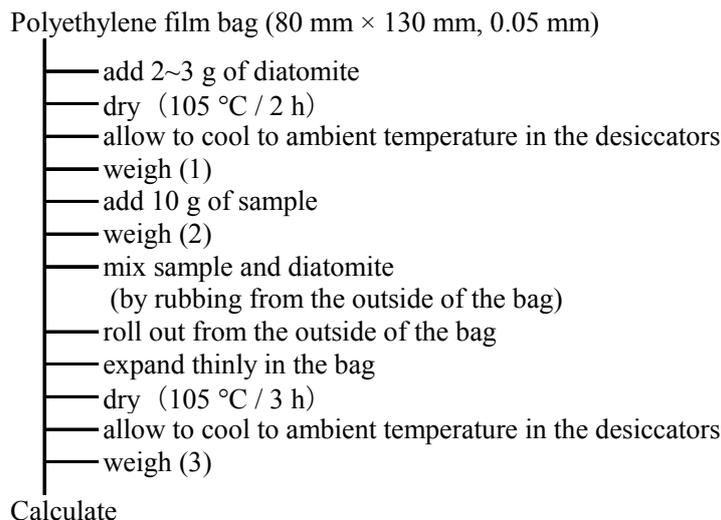
2.4 定量方法

ケイソウ土 2~3 g をポリエチレンフィルム製袋に入れ，袋の口を開いて袋を膨らませた後，105±2 °C で 2 時間乾燥した。乾燥後，袋の口を三つ折りにして閉じ，ゼムクリップで止めてデシケーター中で 15 分間放冷後，ゼムクリップをはずして重さを正確に量った。ひょう量の際には，精密天びんの風防内を携帯型除電器で天びんのひょう量値が安定するまで除電した後，数値を読み取った。以後ひょう量の際は，同様に操作した。

分析試料約 10 g を正確に量って先のポリエチレンフィルム製袋に入れ，袋の口を三つ折りにした後，袋の外側から手で揉んで試料とケイソウ土を混和させた。混和物に粘着性がなく水が浮いた状態の場合は，袋の口を開いて袋を膨らませ，105±2 °C で加熱しながら，ときどき同様に混和させ，粘着性が出るまで予備乾燥した。また，混和物が既に粘着性がある状態の場合は，予備乾燥は行わなかった。混和物を袋の外側から押し伸ばして袋の中に均一に薄く広げた。

次に，袋の口を開いて袋を膨らませ，105±2 °C で 3 時間乾燥した。乾燥途中にときどき袋を取り出し，袋の口の開きを整えると同時に，乾燥が進んで固着して塊状になった混和物を袋の外側から押しつぶしてできるだけ粉末状にした。乾燥後，袋の口を三つ折りにして閉じ，ゼムクリップで止めてデシケーター中で 15 分間放冷後，ゼムクリップをはずして重さを正確に量り，試料中の水分量を算出した。

なお，測定法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for moisture content in wet type pet foods

3 結果及び考察

3.1 検討条件

2.1 で述べたとおり，市販されている犬用及び猫用のウェット製品は，動物質性原料（肉部分）が主体となっている．動物質性試料中の水分の測定法は，食品の方法では食肉及び肉製品は 135 °C で 2 時間，魚介類は 105 °C で 5 時間，いずれも乾燥助剤を添加して常圧加熱乾燥することとなっている．

次に，動物質性以外の原材料としては，野菜類や穀類等の植物性原料，ビタミン，ミネラル等の添加物等が主に使用されており，そのうち野菜類中の水分の測定法は，食品の方法では乾燥助剤を添加して 70 °C で 5 時間減圧加熱乾燥することとなっている．

したがって，ウェット製品に使用される主な原材料の個々の水分の測定法は，食品ではそれぞれ異なった方法となっているため，ウェット製品中には水分の測定法の異なる原材料が混在していることになる．

また，販売用愛がん動物用飼料の原材料表示は，使用している原材料名が記載されているだけでその割合は表示されていないため，例えば原材料の割合に応じて測定方法を使い分けるということができない．

以上のことから，検討方針として上記の食品の方法を基にした複数の方法で Table 2 の試料について測定値の比較検討を行い，原材料の内容及びその割合に関係なく再現性を重要視した 1 つの方法を定義するように，以下の条件で検討を進めることとした．

1) 加熱乾燥条件

上記の食品の方法を参考に，以下の 3 つの加熱乾燥条件で検討を行った．なお，加熱乾燥条件 A 及び B においては，設定した乾燥時間後も更に 1 時間乾燥・ひょう量を最大 5 時間まで繰り返し恒量確認を行った．

加熱乾燥条件 A：常圧 135 °C 加熱・2 時間乾燥

B：常圧 105 °C 加熱・3 時間乾燥

C：3.3 kPa 減圧下 70 °C 加熱・5 時間乾燥

2) ひょう量容器，乾燥助剤，試料採取量

ひょう量容器は，食品の方法で使用されている以下の3つの容器を用いた．

i アルミニウム製ひょう量皿

口径 55 mm，底径 50 mm，深さ 25 mm のものを使用した．

食品の乾燥助剤添加常圧加熱法では，口径 75 mm，底径 70 mm，深さ 35 mm のものを用いているが，試料量及び乾燥助剤量を含めると，全体の重量が最大で 60 g 前後になる．本検討においては，全体の重量を抑えひょう量誤差を小さくするために，飼料分析基準⁴⁾の常圧加熱乾燥法で使用しているものと同サイズのものを用いた．

乾燥助剤は，食品の乾燥助剤添加常圧加熱法では，500~710 μm (30~22 メッシュ) の精製ケイ砂を用いることとなっているが，「飼料分析法・解説 -2009-」⁹⁾の水分の注解及び注意点には，海砂を用いた方法が記載されている．市販のウェット製品 6 点について，5 点併行で水分の測定を行い，*t*-検定を行った結果，両者の結果に有意差は認められなかったため，同法と同じ条件の海砂 10 g，試料採取量 2 g とし検討を行った．この海砂を添加しアルミニウム製ひょう量皿を用いる方法を Scheme 2 の(A)に示した．以降「海砂添加法」という．

ii アルミニウム箔製袋

厚さ 15 μm のアルミニウム箔を封筒状に折って縦約 18 cm，横約 12 cm の袋にしたものを容器として用いた．ウェット製品の中で，水分表示量が 80 %未満の試料はそれ以上の試料と違ってかなり粘着性が高いため，食品の粘質状の穀類加工品に適用されている当該容器を検討した．

乾燥助剤は添加せず，試料採取量は 3 g とした．

この方法を Scheme 2 の(B)に示した．以降「アルミニウム箔法」という．

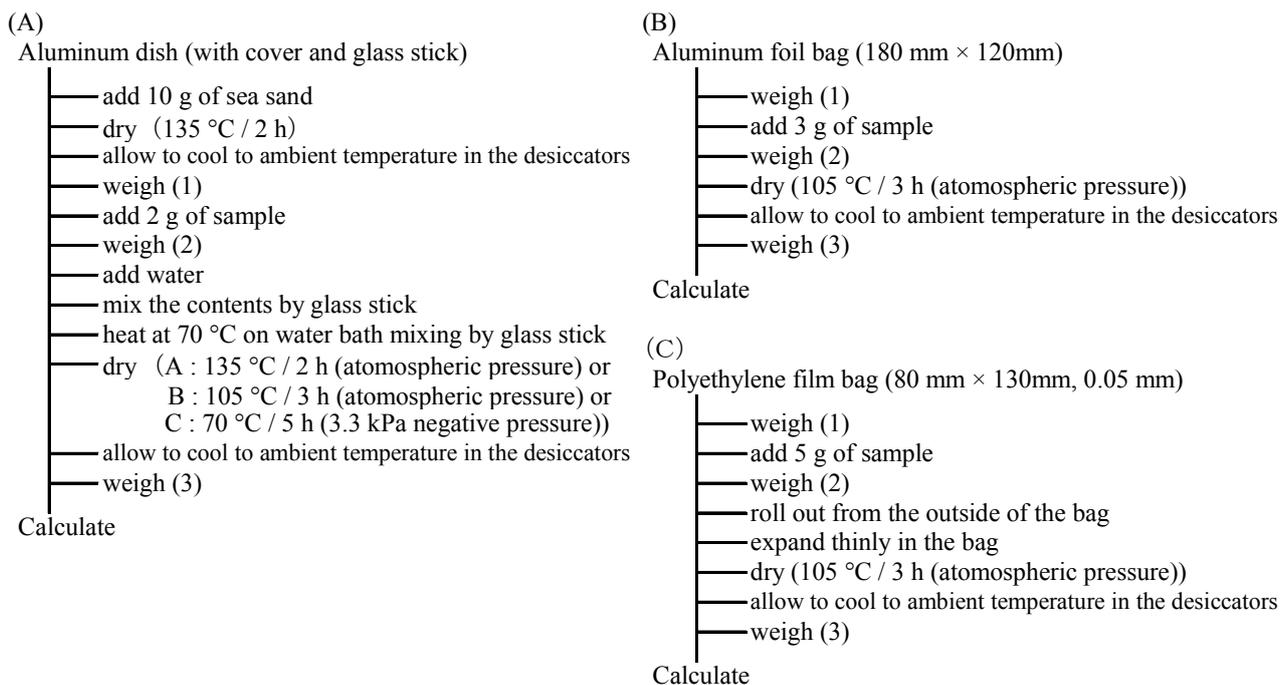
iii ポリエチレンフィルム製袋

粘質状，ペースト状等の一般的に高水分の食品に適用されているポリエチレンフィルム製袋（幅 80 mm，長さ 130 mm，厚さ 0.05 mm の低圧重合のもの）を容器として用いた．このポリエチレンフィルム製袋を用いた方法を以降「ポリエチレンフィルム法」という．

ポリエチレンフィルム法に用いる乾燥助剤は，食品の方法と同様にケイソウ土（ハイフロスーパーセル）2~3 g を用い，試料採取量は 10 g とした．このケイソウ土を添加するポリエチレンフィルム法を Scheme 1 に示した．以降「ケイソウ土添加フィルム法」という．

また，上記 ii と同様に粘着性の高い試料は，乾燥助剤を使わなくても測定が可能であるから，乾燥助剤を添加せず試料採取量を 5 g とした方法も合わせて検討した．この乾燥助剤を添加しないポリエチレンフィルム法を Scheme 2 の(C)に示した．以降「直接フィルム法」という．

なお，ポリエチレンフィルム法は，ポリエチレンフィルム製袋の耐熱限度により加熱温度は 105 $^{\circ}\text{C}$ 以下に限定されることから，1)の加熱乾燥条件 B のみにより検討を行った．



Scheme 2 Analytical procedure for other methods using in this study

3.2 加熱乾燥条件の違いによる測定結果への影響

まず、海砂添加法により全ての加熱乾燥条件で測定を行い、得られた測定値及び相対標準偏差 (RSD) を Table 3 に示した。これらを基に検証を行った。

1) 測定値の検証

試料毎に各加熱乾燥条件での測定値を確認したところ、概ね加熱温度の高い順に水分の測定値も高くなっていったが、一部そうっていない試料もあった。

水分の測定値が加熱温度の高い順になっていない試料については、加熱温度の違いにより測定値に何らかの影響があったものと考え、これらについて検証を行った。

i 試料番号 9

試料番号 9 は、常圧 135 °C での測定値が他法より 3 %程度低い結果であった。当該試料は検討に用いた試料で唯一はちみつを含有しており、はちみつ中の水分は高温ではかえって蒸発しづらいことから、このことが影響しているものと考えられた。

したがって、はちみつを含有しているウェット製品には 135 °C 加熱法は適用できないものと考えられた。

ii 試料番号 20

試料番号 20 は、加熱温度が低いほど水分の測定値が高くなっている。当該試料は、魚肉主体で更に野菜も入っており、これらは食品の方法での加熱温度がそれぞれ 105 °C、70 °C であるため、高温ではかえって水分が蒸発しづらいことが影響しているものと考えられた。

2) ばらつきの検証

Table 3 で相対標準偏差 (RSD) が 0.30 %以上 (下線を付したもの) となった試料について検証を行った。

i 試料番号 1

試料番号 1 は、減圧 70 °C において、相対標準偏差 (RSD) は 0.54 %とかなりのばらつき

が見られた。当該試料は牛肉主体の試料であり、食品の食肉の方法では加熱温度が 135 °C であるため、減圧ではあるものの 70 °C では加熱が不十分でこれがばらつきの要因になっているものと考えられた。

ii 試料番号 5, 9 及び 20

試料番号 5 は、135 °C において、相対標準偏差 (RSD) は 0.30 % であった。Table 3 には 2 時間乾燥後の測定値を示しているが、当該試料は実際恒量となったのが 4 時間乾燥後であり、その測定値は 80.64 % であった。また、当該試料と同じ牛肉主体で野菜入りの試料番号 2 も、ばらつきは少ないものの恒量となったのが 5 時間乾燥後であり、その測定値は 83.42 % であった。また、これら以外に 135 °C で相対標準偏差 (RSD) が 0.3 % 以上となった試料番号 9 及び 20 も野菜が入っていることから、野菜入りの試料を 135 °C で加熱するとばらつきの要因となる何らかの影響があったものと考えられるが、明確な原因はわからなかった。なお、105 °C 以下の測定値ではこのような傾向は見られなかった。

Table 3 Measured value of moisture content with three conditions of drying

Classification of labeled moisture content	Sample				Atmospheric pressure				3.3 kPa negative pressure		
	Main ingredients	No.	Pet food types for	Labeled moisture content (% less than)	A : 135 °C / 2 h		B : 105 °C / 3 h		C : 70 °C / 5 h		
					Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	
more than 80 %	Beef	1	Dogs	85.0	79.72	0.24	79.14	0.25	79.15	<u>0.54</u>	
		2	Dogs	85.0	81.96	0.25			81.29	0.06	
		3	Dogs	95.0							
	+Vegetables	4	Dogs	85.0	83.22	0.14	82.48	0.29			
		5	Dogs	85.0	80.44	<u>0.30</u>	80.17	0.06	79.49	0.29	
	Chicken	6	Dogs	84.0	78.28	0.19					
		7	Dogs	85.0	82.37	0.17	82.21	0.24	82.19	0.15	
		8	Cats	85.0	84.20	0.23	84.18	0.14			
	+Vegetables	9	Dogs	89.0	86.20	<u>0.43</u>	89.29	0.04	89.04	0.09	
	Fish	10	Cats	85.0	84.63	0.23	84.35	<u>0.35</u>			
		11	Cats	80.0	78.86	0.11	78.77	0.13			
		12	Cats	92.0	88.48	0.05	88.39	0.11	88.22	0.09	
		+Vegetables	13	Dogs	89.0	86.11	0.06	85.80	0.09	85.56	0.20
		14	Cats	84.0	84.96	0.07	84.61	0.10	84.48	0.21	
	15	Cats	95.0	89.24	0.02						
less than 80%	Beef	16	Cats	78.0			76.53	0.10			
	Chicken	17	Dogs	77.0	74.19	0.10			73.84	0.05	
		18	Cats	77.0	72.99	0.10					
	Fish	19	Cats	75.0			71.11	0.15			
	+Vegetables	20	Cats	75.0	72.02	<u>0.50</u>	72.67	<u>0.43</u>	72.95	<u>0.45</u>	

a) Mean ($n=5$)

b) Relative standard deviation of repeatability (The underlined value is 0.30 % or more.)

iii 試料番号 10

試料番号 10 は、105 °C の海砂添加法において、相対標準偏差 (RSD) は 0.35 % であったが、その原因を特定できなかった。

以上のとおり、海砂添加法により検討した 3 通りの加熱乾燥条件で、測定する試料によっては何らかの問題が生じることがわかったことから、一つの加熱乾燥条件だけを採用することはできなかった。そこで、他のひょう量容器を用いることによりそれぞれの問題が解決できないかの検討を行った。

3.3 アルミニウム箔法の検討

3.2 の検討で測定値及び相対標準偏差 (RSD) とともに問題があった試料番号 20 の試料は、水分表示量が 80 % 未満であった。ウェット製品の中で、水分表示量が 80 % 未満の試料はそれ以上の試料と違ってかなり粘着性が高い (以下「粘着性試料」という。) ため、乾燥助剤を添加するよりも食品の粘質状の穀類加工品に適用されているアルミニウム箔法が有効ではないかと考え、試料番号 20 の試料を含む水分表示量が 80 % 未満の 5 試料について測定を行った。

その結果は Table 4 のとおりであり、測定値及び相対標準偏差 (RSD) とともに海砂添加法と同等以上の良好な結果が得られた。

特に、試料番号 20 の試料の測定結果は、測定値が海砂添加法で最大値となった 70 °C 減圧加熱乾燥法とほぼ同じであり、相対標準偏差 (RSD) も海砂添加法の約半分程度になるまで改善が見られた。

Table 4 Measured value of moisture content using aluminum foil bag and other method

Sample				Atmospheric pressure						3.3 kPa negative pressure	
Main ingredients	No.	Pet food types for	Labeled moisture content (% less than)	A: 135 °C / 2 h		B: 105 °C / 3 h				C: 70 °C / 5 h	
				Aluminum dish + Sea sand		Aluminum dish + Sea sand		Aluminum foil bag		Aluminum dish + Sea sand	
				Measured value ^{a)}	RSD ^{b)}						
				(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Beef	16	Cats	78.0			76.53	0.10	76.31	0.11		
Chicken	17	Dogs	77.0	74.19	0.10			73.92	0.09	73.84	0.05
	18	Cats	77.0	72.99	0.10			72.35	0.10		
Fish	19	Cats	75.0			71.11	0.15	71.54	0.12		
+Vegetables	20	Cats	75.0	72.02	<u>0.50</u>	72.67	<u>0.43</u>	72.93	0.24	72.95	<u>0.45</u>

a) Mean value (n=5)

b) Relative standard deviation of repeatability (The underlined value is 0.30 % or more.)

そこで、アルミニウム箔法を水分表示量が 80 % 以上のウェット製品 (以下「多水分試料」という。) にも適用できないかの検討を行った。

多水分試料は、水が浮いている (固形物部分と水が分離している固液分離) 状態であり、アルミニウム箔法では粘着性試料のように試料だけを量り取って直接乾燥させることはできないため、乾燥助剤としてケイソウ土 (ハイフラスーパーセル) を添加して検討することとした。

その場合、試料と乾燥助剤を混和する必要があるが、アルミニウム箔の材質上外側から手で揉む等することはできないため、混和にはガラス棒を用いた。

しかし、ガラス棒だけでは試料に粘着性が出るまでうまく混和することができなかった。また

試料のひょう量時も手間がかかること、混和に用いるガラス棒もひょう量する必要があること等から、アルミニウム箔法の多水分試料への適用は断念することとした。

3.4 ポリエチレンフィルム法の検討

3.3 で断念したアルミニウム箔法の代替法として、同じく粘質状、ペースト状等の食品に適用されているポリエチレンフィルム法による検討を以下のとおり行った。

1) 静電気の影響について

ポリエチレンフィルム法でひょう量容器に用いるポリエチレンフィルム製袋は、静電気を帯びやすく、帯電するとひょう量誤差が大きくなる。実際検討当初は、ひょう量値が全く安定しなかったり、同じものをひょう量直後に再度ひょう量するとひょう量値が数 10 mg も違っていたりといった事が常時起こり、静電気の影響に苦慮していた。そこで、ひょう量時に精密天秤の風防内を携帯型除電器で除電した後、ひょう量したところ、上記の現象がなくなりひょう量値が安定した。

したがって、本検討のひょう量時には必ず除電器を用いてひょう量値が安定するまで除電した後、数値を読み取ることとした。

2) 粘着性試料への適用の可否

粘着性試料の測定法としては、Table 4 のとおりアルミニウム箔法が有効であるとの結果が得られているが、同様の手順で測定するポリエチレンフィルム法も適用できないか検討した。

粘着性試料については、ポリエチレンフィルム法も乾燥助剤を用いることなく乾燥できるため、直接フィルム法で測定した。

その結果は Table 5 のとおりであり、直接フィルム法の測定値は、アルミニウム箔法による測定結果と比較してばらつきが小さく、その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 0.17 %以下であった。また、測定値も他法と比較して問題となるような結果は認められなかった。特に 3.2 の検証で述べた他法でばらつきが大きかった試料番号 20 の試料についても繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 0.13 %であり、再現性の点で有効であることがわかった。

Table 5 Measured value of moisture content using polyethylene film bag and other method
(in wet type pet foods (labeled moisture content : less than 80 %))

Main ingredients	Sample			Aluminum foil bag		Polyethylene film bag	
	No.	Pet food types for	Labeled moisture content (% less than)	Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
Beef	16	Cats	78.0	76.31	0.11	76.94	0.08
Chicken	17	Dogs	77.0	73.92	0.09	74.28	0.17
		Cats	77.0	72.35	0.10	72.63	0.06
Fish	19	Cats	75.0	71.54	0.12	71.32	0.06
+Vegetables	20	Cats	75.0	72.93	0.24	72.17	0.13

a) Mean value (n=5)

b) Relative standard deviation of repeatability

3) 高水分試料への適用の可否

一般に高水分食品に適用されるポリエチレンフィルム法は、乾燥助剤としてケイソウ土（ハ

イフラスーパーセル) 2~3 g を添加してポリエチレンフィルム製袋で乾燥していることから、本検討においても同様に測定した。

その結果を Table 6 に示した。ケイソウ土添加フィルム法は、海砂添加法による各加熱乾燥条件での測定結果と比較してほとんど全ての試料でばらつきが一番小さく、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 0.13 % 以下であった。測定値も海砂添加法で見られた加熱温度が高くなるほど高くなる傾向には当てはまらず、135 °C 常圧加熱乾燥法の測定値と同等又は上回るものもあって、問題となるような結果は認められなかった。特に、他の方法でばらつきが大きい等何らかの問題があった試料番号 1, 2, 5, 8, 9 及び 10 についても、ケイソウ土添加フィルム法では問題のない結果が得られた。

以上の結果から、高水分試料の水分測定法としてケイソウ土添加フィルム法は適用可能であると考えられた。

Table 6 Measured value of moisture content using polyethylene film bag and other method
(in wet type pet foods (labeled moisture content : more than 80 %))

Sample				Atmospheric pressure						3.3 kPa negative pressure	
				A : 135 °C / 2 h		B : 105 °C / 3 h				C : 70 °C / 5 h	
Main ingredients	No.	Pet food types for	Labeled moisture content (% less than)	Aluminum dish +Sea sand		Aluminum dish +Sea sand		Polyethylene film bag +Diatomite		Aluminum dish +Sea sand	
				Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
Beef	1	Dogs	85.0	79.72	<u>0.24</u>	79.14	<u>0.25</u>	79.69	0.02	79.15	<u>0.54</u>
	2	Dogs	85.0	81.96	<u>0.25</u>			81.67	0.13	81.29	0.06
	3	Dogs	95.0					91.73	0.03		
+Vegetables	4	Dogs	85.0	83.22	0.14	82.48	<u>0.29</u>	82.78	0.12		
	5	Dogs	85.0	80.44	<u>0.30</u>	80.17	0.06	80.74	0.06	79.49	<u>0.29</u>
Chicken	6	Dogs	84.0	78.28	0.19			78.21	0.04		
	7	Dogs	85.0	82.37	0.17	82.21	<u>0.24</u>	82.17	0.05	82.19	0.15
	8	Cats	85.0	84.20	<u>0.23</u>	84.18	0.14	84.48	0.08		
+Vegetables	9	Dogs	89.0	86.20	<u>0.43</u>	89.29	0.04	89.25	0.02	89.04	0.09
Fish	10	Cats	85.0	84.63	<u>0.23</u>	84.35	<u>0.35</u>	84.95	0.12		
	11	Cats	80.0	78.86	0.11	78.77	0.13	78.79	0.03		
	12	Cats	92.0	88.48	0.05	88.39	0.11	88.17	0.03	88.22	0.09
+Vegetables	13	Dogs	89.0	86.11	0.06	85.80	0.09	86.34	0.07	85.56	<u>0.20</u>
	14	Cats	84.0	84.96	0.07	84.61	0.10	84.47	0.02	84.48	<u>0.21</u>
	15	Cats	95.0	89.24	0.02			89.28	0.03		

a) Mean value (n=5)

b) Relative standard deviation of repeatability (The underlined value is 0.20 % or more.)

3.5 ケイソウ土添加フィルム法及び直接フィルム法の適用範囲の検討

これまでの検討を踏まえ、水分表示量 80 %未満のウェット製品を粘着性試料、80 %以上のウェット製品を高水分試料と便宜上区分し、粘着性試料は直接フィルム法を、高水分試料はケイソウ土添加フィルム法を適用することとして検討を行ってきた。しかし、愛がん動物用飼料の水分表示量は最大表示であることから、特に水分表示量 80 %以上の製品で実際の水分含量が 80 %未満であるものが存在する可能性は十分に考えられ、また、その逆の場合も考えられるため、両方法で測定可能な試料の水分量の範囲及び両方法による測定値の比較検討を行うこととした。

そこで、3.4 の 3) における検討において水分測定値が 80 %未満となった 3 検体について、直接フィルム法で水分の測定を行い、ケイソウ土添加フィルム法の結果との比較を行った。

また、これとは逆に、粘着性試料 5 検体について、ケイソウ土添加フィルム法で水分の測定を行い、直接フィルム法の結果との比較を行った

その結果は Table 7 のとおりであり、以下のとおり検証を行った。

Table 7 Measured value of moisture content using polyethylene film bag and polyethylene film bag with diatomite

Classification of labeled moisture content	Sample				Polyethylene film bag +Diatomite		Polyethylene film bag	
	No.	Pet food types for	Labeled moisture content (% less than)	Labeled crude fat content (% more than)	Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
more than 80 %	1	Dogs	85.0	0.7	79.69	0.02	79.55	0.23
	6	Dogs	84.0	2.5	78.21	0.04	78.23	0.05
	11	Cats	80.0	2.0	78.79	0.03	78.82	0.06
less than 80%	16	Cats	78.0	2.0	76.86	0.04	76.94	0.08
	17	Dogs	77.0	6.0	74.11	0.05	74.28	0.17
	18	Cats	77.0	2.3	72.54	0.03	72.63	0.06
	19	Cats	75.0	1.5	71.28	0.03	71.32	0.06
	20	Cats	75.0	1.5	72.53	0.06	72.17	0.13

a) Mean value ($n=5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

1) 適用範囲について

直接フィルム法は、試料が粘着性のある状態でなければ測定が困難であるが、検討した水分表示量が 80 %以上の 3 検体については粘着性を保っていて、測定は可能であった。ただし、これ以上水分量が高くなると測定が困難であると思われた。

一方、ケイソウ土添加フィルム法は、水分表示量 80 %未満の 5 検体で検討を行ったが、いずれもケイソウ土を添加して試料との混和物が粘着性を保つのは可能であった。ただし、試料によっては混ざりにくいものもあったが、ケイソウ土の量を 2 g 程度に減らすことにより解消することができた。

2) 測定値について

検討した 8 検体のうち 6 検体で直接フィルム法の測定値が高くなっているが、うち 5 検体はその差が 0.1 %以内であり、ほぼ同様の結果が得られた。

3) ばらつきについて

ケイソウ土添加フィルム法及び直接フィルム法の測定結果の繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) としてそれぞれ 0.06 %以下及び 0.23 %以下であり、ケイソウ土添加フィルム法の結果が良好であった。しかも検討した 8 検体全ての試料について、ケイソウ土添加フィルム法の相対標準偏差 (RSD) が小さかった。

また、直接フィルム法で相対標準偏差が 0.10 %を超えたものが 3 検体あり、これらは 2) で述べた測定値の差が 0.1 %以内にならなかった 3 検体であった。

以上のことから、通常はケイソウ土添加フィルム法も直接フィルム法も良好に測定できるものの、試料に含まれる物質によって直接フィルム法は測定に影響を受けやすく、そのことが両者の差となっているのではないかと考えられた。

4) 試料番号 17 について

試料番号 17 を直接フィルム法で測定を行ったところ、試料が脂状に固結しており、袋の内部も脂が浮いたような状態であった。そこでその原因を調べたところ、当該試料は粗脂肪表示量が 6.0 %以上（乾物換算で 23.2 %以上）で今回検討に用いた試料の中で最も脂肪分の高い試料であった（他の試料の中で最大表示量は 3.0 %以上）。

一方、ケイソウ土添加フィルム法で測定したところ、乾燥後の試料及びケイソウ土は他の試料と同様に粉状に乾燥されており、若干袋の内側が脂っぽい感じではあるものの、特に問題は認められなかった。

したがって、3) で述べた測定に影響を与える物質の一つとしてこの脂肪分が考えられ、直接フィルム法はケイソウ土添加フィルム法に比べこの脂肪分の影響を受けやすいものと考えられた。

5) 試料番号 20 について

試料番号 20 の試料は、各方法でのばらつきが大きい中で、ポリエチレンフィルム法だけはばらつきが小さかった。当該試料は粘着性の高い試料であるため、ポリエチレンフィルム法のように試料を薄く押し伸ばし、更に乾燥助剤の添加で表面積が広がり、水分が飛びやすい状態で乾燥することでばらつきが改善されたものと考えられた。

以上 1)~5)の結果から、ウェット製品中の水分の測定法として、ケイソウ土添加フィルム法のみを適用することとし、以後の検討を行った。

3.6 高脂肪試料の検討

3.5 の 4)で、脂肪分が水分の測定に影響を与える可能性について言及したが、検討に用いた試料の中に粗脂肪表示量 5.0 %の試料番号 2 があり、試料番号 17 の試料とともに各加熱乾燥条件での比較検討を行った。なお、条件 C の減圧 70 °C・5 時間の条件においては、ケイソウ土添加フィルム法で測定し、試料番号 17 は水分表示量が 77.0 %以下であるため、アルミニウム箔法でも測定した。その結果を、Table 8 に示した。

まず、試料番号 2 の試料については、加熱温度が高いほど測定値も高くなったが、加熱温度が一番高い条件 A でのばらつきが大きくなった。乾燥後の試料の状態については、いずれも脂が浮くといった状態は見られなかった。

次に、試料番号 17 の試料については、いずれの方法も大きなばらつきもなくほぼ同様の結果が得られ、数値的には問題のない状態であった。しかし、乾燥後の試料の状態について、条件 A においては、焦げ付き等は見られなかったものの、試料と海砂が完全に固結してしまっており、恒量になるのに 4 時間かかった。その他は前述のとおり直接フィルム法で脂状に固結した以外は特に問題は見られず、ケイソウ土添加フィルム法は測定条件の違いに関係なく良好な結果が得られた。

したがって、高脂肪試料の水分測定法として、条件 A は適さないこと、ケイソウ土添加フィルム法が有効であることがわかった。

Table 8 Measured value of moisture content by high fat content sample

No.	Sample			Atmospheric pressure								3.3 kPa negative pressure	
				A : 135 °C / 2 h				B : 105 °C / 3 hour				C : 70 °C / 5 hour	
	Pet food types for	Labeled moisture content (% less than)	Labeled crude fat content (% more than)	Aluminum dish +Sea sand		Polyethylene film bag +Diatomite		Polyethylene film bag		Aluminum foil bag		Polyethylene film bag +Diatomite	
				Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Measured value ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
2	Dogs	85.0	5.0	81.96	<u>0.25</u>	81.67	0.13	—	—	—	—	81.29	0.06
17	Dogs	77.0	6.0	74.19	0.10	74.11	0.05	74.28	0.17	73.92	0.09	73.84	0.05

a) Mean value (n=5)

b) Relative standard deviation of repeatability (The underlined value is 0.20 % or more.)

4 まとめ

愛がん動物用飼料のウェット製品中の水分の測定方法として、ポリエチレンフィルム製袋を用いた常圧加熱乾燥法を検討したところ、次の結果が得られた。

- 1) 乾燥助剤としてケイソウ土（ハイフラスーパーセル）を添加混合して、ポリエチレンフィルム製袋で乾燥するケイソウ土添加フィルム法でウェット製品を測定した結果、検討した全ての試料においてその繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 0.13 %以下であり、良好に測定することができた。
- 2) ポリエチレンフィルム製袋は、静電気を帯びやすく、帯電するとひょう量誤差が大きくなるため、ひょう量時に除電器を用いてひょう量値が安定するまで除電した後、数値を読み取ることにより静電気の影響を排除することができた。

文 献

- 1) 農林水産省令・環境省令：愛がん動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，省令第 1 号 (2009).
- 2) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛がん動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号 (2009).
- 3) AOAC Official Methods of Analysis, Chapter 4, 4.1.09, 4-4(1995).
- 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) ISO 6496:1999 : Animal feeding stuffs -- Determination of moisture and other volatile matter content (1999).
- 6) AOAC Official Methods of Analysis, Chapter 4, 4.1.06, 2-2(1995).
- 7) 社団法人日本食品科学工学会，新・食品分析法編集委員会編：新・食品分析法（株式会社光琳）(1996).
- 8) 財団法人日本食品分析センター：分析実務者が書いた五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説 (2001).
- 9) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター飼料分析基準研究会編著：飼料分析法・解説 -2009-, 26 (2009).

5 愛がん動物用飼料（ウェット製品）中のクロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンのガスクロマトグラフによる同時定量法

屋方 光則*

Determination of Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion in Wet Type Pet Foods by GC-FPD

Mitsunori YAKATA*

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

An analytical method for determination Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion in wet type pet foods using Gas chromatography equipped with flame-photometric detector (GC-FPD) was developed. Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion was extracted with 100 mL of ethyl acetate and filtered. All sample solution was evaporated to dryness. The residue was dissolved in cyclohexane-acetone (7:3). It was purified by gel permeation chromatography (GPC) with cyclohexane-acetone (7:3) and SampliQ Florisil PR cartridge with 2,2,4-trimethyl pentane-acetone (4:1). The elute subjected to GC-FPD on a fused silica capillary column (DB-5; 0.25 mm i.d.× 30 m, film thickness 0.25 μm (Agilent Technologies)) for determination of Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion. A recovery test was conducted using four kinds of wet type pet foods spiked with Chlorpyrifos-methyl and Malathion at 2 and 0.05 mg/kg, Pirimiphos-methyl at 1 and 0.05 mg/kg. The mean recoveries of Chlorpyrifos-methyl were 74.1~93.8 % and the relative standard deviations (RSD) were within 9.5 %. Pirimiphos-methyl were 73.9~94.0 % and the relative standard deviations (RSD) were within 8.4 %. Malathion were 70.5~94.5 % and the relative standard deviations (RSD) were within 13 %. A collaborative study was conducted in seven laboratories using three kinds of pet foods spiked with Chlorpyrifos-methyl and Malathion at 2 and 0.05 mg/kg, Pirimiphos-methyl at 0.5 and 0.05 mg/kg. The mean recoveries of Chlorpyrifos-methyl were 93.5~103 % and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 6.4 %, 16 % and 0.73 respectively. Pirimiphos-methyl were 94.6~95.3 %, 4.7 %, 14 % and 0.62 respectively. Malathion were 93.4~102 %, 7.1 %, 18 % and 0.84 respectively.

Key words: pesticide residue ; Chlorpyrifos-methyl ; Pirimiphos-methyl ; Malathion ; Gas chromatography equipped with flame-photometric detector (GC-FPD) ; gel permeation chromatography (GPC) ; collaborative study

キーワード：残留農薬；クロルピリホスメチル；ピリミホスメチル；マラチオン；炎光光度検出器付きガスクロマトグラフ；ゲル浸透クロマトグラフィー；共同試験

* 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

1 緒 言

クロルピリホスメチルは、ダウ・ケミカル社（米国）が開発した有機リン系殺虫剤で、1974年に日本での農薬登録が行われている。化学構造上似ているクロルピリホスより人畜毒性、魚毒性ともに低く、広範囲の害虫に使用されている^{1),2)}。

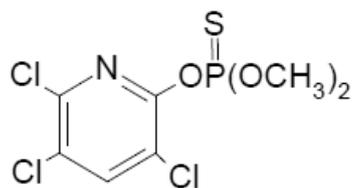
ピリミホスメチルは、ICI社（スイス）が開発した有機リン系殺虫剤で、1976年に日本での農薬登録が行われている。接触作用とくん蒸作用の両方で効果を示し、倉庫等の衛生害虫駆除としても使用されている^{1),2)}。

マラチオンはACC社（ドイツ）が開発した有機リン系殺虫剤で、1953年に日本での農薬登録が行われている。植物体組織中で分解されやすく、また、植物体表面からの揮散や分解によっても失われるので残効期間は短い^{1),2)}。

愛がん動物用飼料中のこれらの農薬の基準値³⁾は、クロルピリホスメチル及びマラチオンで10 ppm、ピリミホスメチルで2 ppmとされている。現在、愛がん動物用飼料等の検査法⁴⁾に記載されている、クロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンを対象とする分析法は「有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法」（以下「ドライ法」という。）であるが、適用範囲がドライ及びセミドライ製品であり、ウェット製品を適用範囲とする分析法が記載されていないことから検討することが急務となっていた。

ウェット製品中のこれら農薬の分析法は、財団法人日本食品分析センターが「平成21年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業」で開発したクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンの同時定量法⁵⁾（以下「分析センター法」という。）が報告されている。筆者は分析センター法を基に、愛がん動物用飼料等の検査法への適用の可否についての検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、クロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンの構造式をFig. 1に示した。また、これら農薬の愛がん動物用飼料中の基準値（水分含有量10%に換算したものに対して）と水分含有量が80%の場合のウェット製品の現物中の基準値の比較をTable 1に示した。

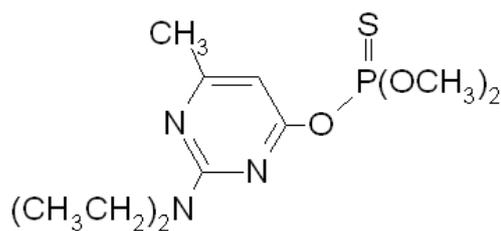


Chlorpyrifos-methyl

O,O-dimethyl *O*-3,5,6-trichloro-2-pyridyl
phosphorothioate

C₇H₇Cl₃NO₃PS MW: 322.5

CAS No.: 5598-13-0

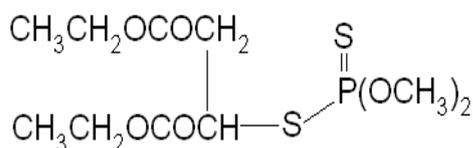


Pirimiphos-methyl

O-2-diethylamino-6-methylpyrimidin-4-yl
O,O-dimethyl phosphorothioate

C₁₁H₂₀N₃O₃PS MW: 305.3

CAS No.: 29232-93-7



Malathion

S-1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethyl
O,O-dimethyl phosphorodithioate

C₁₀H₁₉O₆PS₂ MW: 330.4

CAS No.: 121-75-5

Fig. 1 Chemical structures of Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion

Table 1 Standard value of Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion

Pesticide	Standard value	Wet type product*
	(ppm)	(mg/kg)
Chlorpyrifos-methyl	10	2.2
Pirimiphos-methyl	2	0.44
Malathion	10	2.2

※ Standard value of wet type product when containing 80 % moisture .

2 実験方法

2.1 試料

愛がん動物用飼料犬用ウェット製品 2 種類及び猫用ウェット製品 2 種類をフードプロセッサーで粉砕し供試試料として用いた。それぞれに表示されていた原材料を Table 2 に示した。

Table 2 Ingredients list of pet foods

Pet food types	Ingredients
Wet type for adult dogs 1	Meat (Chicken, Beef, Mutton), Wheat flour, Culinary plants (Potato, Carrot, Green peas), Minerals (Cl,Na,K,Mg,Zn,Se,I), Emulsifier, Thickening agent, Coloring agent (Caramel, Titanium dioxide, colcothar), Vitamins (Choline chloride, Pantothenic acid, Biotin, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, B ₉),
Wet type for adult dogs 2	Meat (Chicken), Rice, Carrot, Corn, Dietary fiber, Vitamins (B ₁₂ , D, E, Choline chloride, Pantothenic acid, B ₉), Minerals (Ca, K, Na, S, Zn), Glycine, Thickening agent, Phosphate (Ca, Na), Color coupler (Nitrous acid Na), Coloring agent (Colcothar, Titanium dioxide)
Wet type for adult cats 1	Turkey, Pork, Salmon, Rice, Cornstarch, Cellulose, Wheat, Chicken extract, Soy bean, Chicken, Animal fats, Corn gluten, Yeast, Minerals, Vitamins Amino acid (Taurine, methionine), Thickening agent
Wet type for adult cats 2	Tuna, Pork, Wheat gluten, Chicken, Soy bean protein, Spinach, Glucose Minerals, Vitamins, Amino acid, Thickening agent (Modified starch), Coloring agent (Edible red No.3, Titanium dioxide)

2.2 試薬

1) クロルピリホスメチル標準原液

クロルピリホスメチル標準品（Dr. Ehrenstorfer 製，純度 97.5 %）20 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトン 20 mL を加えて溶かし，更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えてクロルピリホスメチル標準原液を調製した（この液 1 mL は，クロルピリホスメチルとして 0.2 mg ($f=0.975$) を含有する.）.

2) ピリミホスメチル標準原液

ピリミホスメチル標準品（Dr. Ehrenstorfer 製，純度 99.0 %）20 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトン 20 mL を加えて溶かし，更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えてピリミホスメチル標準原液を調製した（この液 1 mL は，ピリミホスメチルとして 0.2 mg ($f=0.990$) を含有する.）.

3) マラチオン標準原液

マラチオン標準品（Dr. Ehrenstorfer 製，純度 99.0 %）20 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトン 20 mL を加えて溶かし，更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えてマラチオン標準原液を調製した（この液 1 mL は，マラチオンとして 0.2 mg ($f=0.990$) を含有する.）.

4) 混合標準液

クロルピリホスメチル標準原液，ピリミホスメチル標準原液及びマラチオン標準原液の一定量を混合した後，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 中にクロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンとしてそれぞれ 0.05，0.1，0.5，1，2 及び 5 μ g を含有する各混合標準液を調製した.

5) 酢酸エチル，シクロヘキサン及びアセトンは残留農薬分析用を用いた．2,2,4-トリメチルペンタンは高速液体クロマトグラフ用を用いた.

2.3 装置及び器具

- 1) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W
- 2) ロータリーエバポレーター：東京理化学器械製 NAJ-160
- 3) ガスクロマトグラフ：Agilent Technologies 製 6890N
- 4) ゲル浸透クロマトグラフ：日本分光製 GPC システム
 ポンプ：PU-2080
 オートサンプラー：AS-2050
 フラクションコレクター：SF-212N
- 5) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Agilent Technologies 製 SampliQ Florisil PR（充てん剤量 500 mg, リザーバー量 3 mL）
- 6) メンブレンフィルター：東洋濾紙製 DISMIC-25HP（孔径 0.45 μm , 直径 25 mm, PTFE）

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 20.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、酢酸エチル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。300 mL のなす形フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次酢酸エチル 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。ろ液を 40 °C 以下の水浴で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 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、1,800 \times g（3,000 rpm）で 5 分間遠心分離した後、メンブレンフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

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、各農薬が溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。なお、ゲル浸透クロマトグラフィーの条件を Table 3 に示した。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）5 mL を正確に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。

Table 3 Operating conditions of GPC for analysing Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion

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

3) カラム処理

試料溶液を合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに入れ、初めの流出液 2 mL を捨て、その後の流出液 1~2 mL を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

試料溶液及び各標準液各 1 μ L をガスクロマトグラフに注入し、Table 4 の測定条件に従ってクロマトグラムを得た。

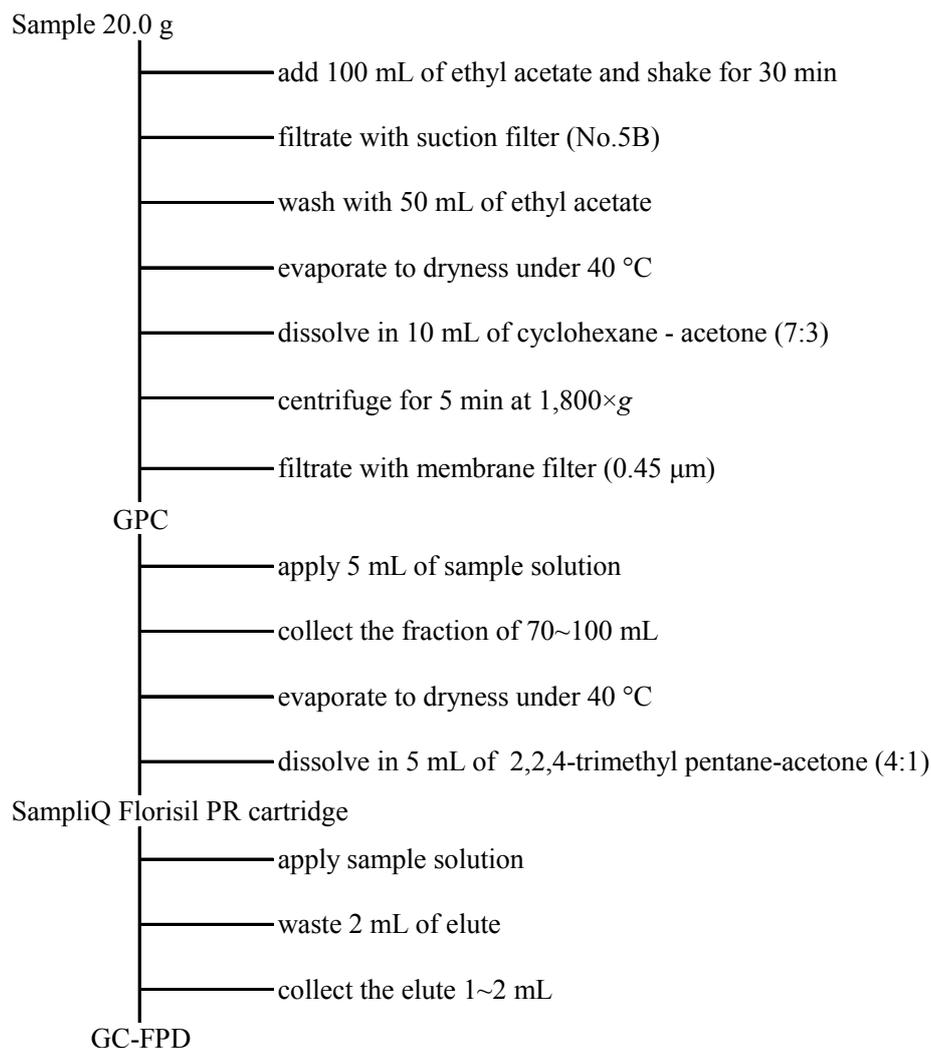
Table 4 Operating conditions for GC-FPD for analysing Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion

Column	DB-5 (0.25 mm i.d. \times 30 m, 0.25 μ m film thickness)
Column temperature	60 $^{\circ}$ C (1 min) \rightarrow 20 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 170 $^{\circ}$ C \rightarrow 2 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 210 $^{\circ}$ C \rightarrow 20 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 250 $^{\circ}$ C (3 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection temperature	240 $^{\circ}$ C
Carrier gas	He 1.5 mL/min
Hydrogen	75 mL/min
Air	100 mL/min
Make up gas	He (30 mL/min)
Detector	FPD (P-Filter)
Detector temperature	250 $^{\circ}$ C
Injection volume	1 μ L

5) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンの量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion in wet type pet foods

3 結果及び考察

3.1 抽出方法の検討

分析センター法による抽出方法は、アセトニトリルを用いて抽出し、多孔性ケイソウ土カラムで精製後、ゲル浸透クロマトグラフに供することとしている。分析センター法を用いて犬用ウェット製品 2 種、猫用ウェット製品 2 種の試料の抽出精製を試みたところ、犬用 1 種、猫用 1 種で抽出液の濃縮乾固時にゲル状のエマルジョンが発生し乾固操作及びその後のカラム処理が不可能であった。エマルジョンの発生は抽出液中に多量の水分と油分が混在することが原因と考えられることから、抽出溶媒にアセトニトリルより極性が低い溶媒を用いて、水分の抽出を抑える方法を検討した。抽出液に酢酸エチルを使用し、先の 4 種の試料のほか、犬用ウェット製品 5 種及び猫用ウェット製品 8 種を用いて抽出したところ、全ての試料でエマルジョンは発生しなかった。

また、分析センター法⁵⁾は、愛がん動物用飼料等の検査法⁴⁾に記載されているドライ法を基としているが、ドライ法では多孔性ケイソウ土カラムは使用されていない。このことから多孔性ケイソウ土カラムの省略の可否について、本法による添加回収試験を実施して確認したところ、

Table 5 のとおり良好な結果が得られた。これらのことから抽出溶媒には酢酸エチルを用い、多孔性ケイソウ土カラムによる精製は行わないこととした。

Table 5 Recoveries for extraction by ethyl acetate

Pesticide	Spike Level (mg/kg)	Wet type for Dogs		Wet type for Cats	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
Chlorpyrifos-methyl	1	85.3	1.8	86.7	5.2
Pirimiphos-methyl	1	94.0	3.2	94.0	1.1
Malathion	1	83.7	5.4	85.0	4.7

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.2 抽出溶媒の検討

一般的に農薬分析の抽出溶媒は、アセトニトリルやアセトン等の水と親和性のある比較的極性の高い溶媒が多用されるが、今回、抽出溶媒として極性の低い酢酸エチルを用いることにしたことから、農薬に自然汚染された試料においても 3.1 の検討と同程度の回収率が得られるか検討を行った。対象試料については、農薬に自然汚染された愛がん動物用飼料を入手することが困難であったことから、以下のように調製を行い自然汚染された状態に近似させた試料を用いることとした。まず、小麦粉 10 g を 50 ml 容のプラスチックチューブに入れクロルピリホスメチル及びマラチオンとして 4 mg/kg、ピリミホスメチルとして 1 mg/kg 相当量を添加し、溶媒が十分に揮散するまで 14 時間静置した後、ふたをして良く混合した。次に、2.1 により調製した犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品を 50 mL 容の各ビーカーに 19 g ずつ入れた。更に、先に調製した小麦粉 1 g ずつを各ビーカーに加え、かき混ぜた後、ラップをかけ 4 時間静置した。

このように調製した試料を用いて、本法に従って添加回収試験を実施した。結果は Table 6 のとおりであり、良好な回収率が得られたことから、抽出溶媒として酢酸エチルを使用することに問題は認められなかった。

Table 6 Recoveries from pet food which was polluted like a naturally by pesticide

Pesticide	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	
		Wet type for dogs	Wet type for cats
Chlorpyrifos-methyl	0.2	80.2	79.9
Pirimiphos-methyl	0.05	84.8	86.2
Malathion	0.2	81.5	83.2

a) Mean ($n=1$)

3.3 測定条件について

ドライ法では有機リン系農薬 25 成分をカラム槽温度、使用カラム及び検出器温度の違う測定条件 AB の二つのグループに分け測定することとしている。ピリミホスメチル及びマラチオンは A

グループ、クロルピリホスメチルは B グループに属している。分析センター法ではドライ法と同じ測定条件を適用しているが、分析センター法検討の中で AB グループの測定条件のどちらを用いても各農薬ともに測定が可能であることが報告されている。今回の検討では作業時間の省力化の観点から、A グループの測定条件を基にクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンを 3 成分同時測定することとした。

なお、溶出順が最後となるマラチオンが 200 °C 前後で溶出することから、昇温条件を変更して、210 °C 以降の昇温ペースを 20 °C にし測定時間の短縮を図ることとした。

3.4 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの溶出画分の検討

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの溶出画分の確認を行った。犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品を 2.4 の 1)及び 2)により操作した試料溶液にクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンとして各 1 mg/kg 相当量を添加し、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに負荷し各農薬を画分に溶出した。その後、本法により測定し溶出画分の回収率を確認した。なお、流出液量は全体で約 4 mL であった。その結果 Table 7 のとおり流出液 0~1 mL では低回収率であったが 1 mL 以降の溶出では良好な回収率が得られた。本法では安全性を見て初めの流出液 2 mL を捨て、その後の流出液 1~2 mL を測定に供することとした。

Table 7 Elution pattern from Florisil mini column

Pesticide	Recoveries of pesticide ^{a)} (%)							
	Wet type for dogs				Wet type for cats			
	0~1 mL	~2 mL	~3 mL	~4 mL	0~1 mL	~2 mL	~3 mL	~4 mL
Chlorpyrifos-methyl	75.9	92.5	95.3	98.0	75.5	95.5	97.7	98.1
Pirimiphos-methyl	77.5	92.4	95.5	97.3	74.8	96.4	96.8	96.1
Malathion	47.4	88.2	93.4	96.5	41.5	90.3	94.5	95.5

a) Mean($n=2$)

3.5 検量線の作成

2.2 の 4)に従って調製した各標準液 (0.05~5 µg/mL) 各 1 µL をガスクロマトグラフに注入し、得られたクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンのピーク面積又は高さを用いて検量線を作成した。その結果、検量線はクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンとしてそれぞれ 0.05~5 µg/mL (注入量として 0.05~5 ng) の範囲で直線性を示した。得られた検量線の例を Fig 2 に示した。

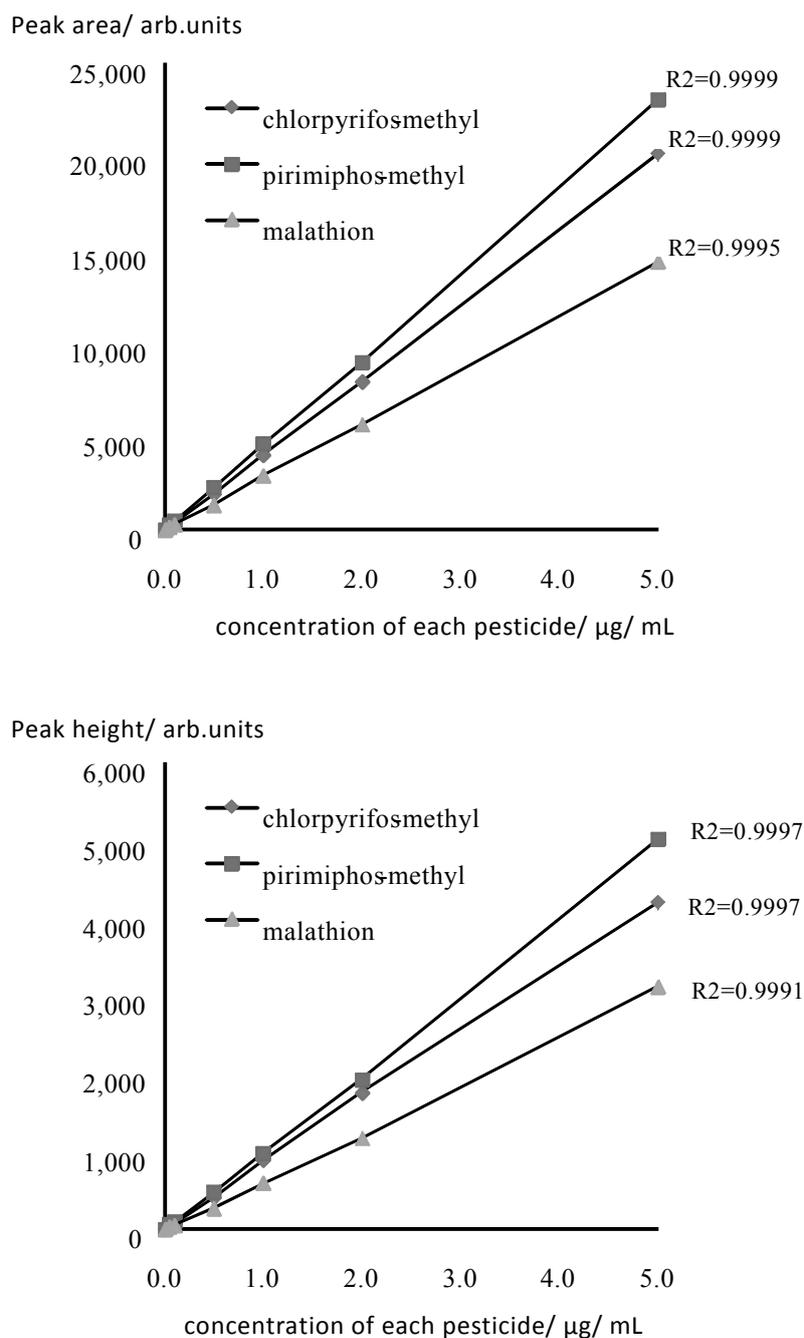


Fig. 2 Calibration curves of Chlorpyrifos-methyl, Pirimiphos-methyl and Malathion

3.6 妨害物質の検討

市販の愛がん動物用飼料（犬用ウェット製品 7 種，猫用ウェット製品 11 種）を本法に従って分析を行い，妨害ピークの有無を確認した。

その結果，クロルピリホスメチル等の定量を妨害するピークは認められなかった。

3.7 添加回収試験

犬用ウェット製品 2 種及び猫用ウェット製品 2 種にクロルピリホスメチル及びマラチオンとして 2 mg/kg 相当量，ピリミホスメチルとして 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて本法により

5点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果、Table 8 のとおりクロルピリホスメチルについては平均回収率 89.7~93.8 %，その精度は相対標準偏差(RSD)として 3.9 %以下，ピリミホスメチルについては平均回収率 80.8~88.5 %，その精度は相対標準偏差(RSD)として 5.1 %以下，マラチオンについては平均回収率 92.1~94.5 %，その精度は相対標準偏差(RSD)として 3.6 %以下の成績が得られた。

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 8 Recoveries of pesticide from four kinds of pet food

Pesticide	Spike level (mg/kg)	Wet type for dogs1		Wet type for dogs 2		Wet type for cats 1		Wet type for cats 2	
		Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}						
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Chlorpyrifos-methyl	2	89.9	3.9	93.8	1.8	89.7	2.5	91.5	1.9
Pirimiphos-methyl	0.5	82.9	4.0	80.8	5.1	84.4	2.8	88.5	1.4
Malathion	2	93.6	3.6	94.5	2.1	92.1	2.7	92.8	2.9

a) Mean ($n=5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

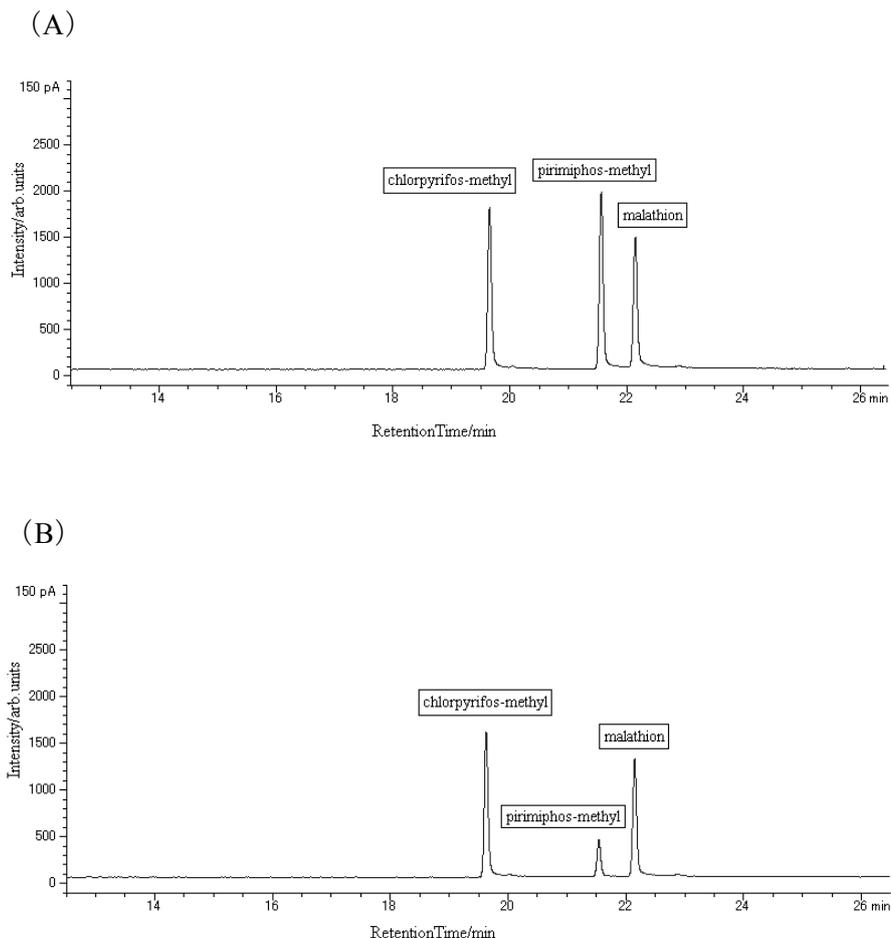


Fig. 3 Chromatograms of each pesticide

(A) Mix Standard solution (The amount was each 4 ng.)

(B) Sample solution of wet type pet food for cats spiked chlorpyrifos-methyl and malathion at 2 mg/kg, pirimiphos-methyl at 0.5 mg/kg

3.8 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、添加回収試験により得られるピークの SN 比、回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は、最も低いマラチオンで、0.05 mg/kg であり、 SN 比が 3 以上となる濃度は 0.02 mg/kg であった。

確認のために、犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品にクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンとして 0.05 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 3 点併行分析を実施した。その平均回収率及び繰返し精度は、Table 9 のとおりであった。

以上の結果から、本法の定量下限は 0.05 mg/kg、検出下限は 0.02 mg/kg であった。

Table 9 Recoveries at the level of limit of quantitation

Pesticide	Spiked level (mg/kg)	Wet type for dogs1		Wet type for dogs2		Wet type for cats1		Wet type for cats2	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)						
Chlorpyrifos-methyl	0.05	75.7	3.5	87.9	1.9	74.1	4.6	83.9	9.5
Pirimiphos-methyl	0.05	76.3	4.9	83.4	6.7	73.9	4.8	78.5	8.4
Malathion	0.05	71.8	2.1	81.5	11	70.5	1.4	91.5	13

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.9 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

成犬用ウェット製品 A 及び成猫用ウェット製品にクロルピリホスメチルとして 2 mg/kg 相当量、ピリミホスメチルとして 0.5 mg/kg 相当量、マラチオンとして 2 mg/kg 相当量を添加した。また、成犬用ウェット製品 B にクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンとして各 0.05 mg/kg 相当量を添加した。以上の試料を用いて、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センター（計 7 試験室）において本法に従って共同試験を実施した。

クロルピリホスメチルでの結果は Table 10 のとおりであり、成犬用ウェット製品 A では、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相対標準偏差（ RSD_f 及び RSD_R ）として 2.3 %及び 7.0 %であり、HorRat は 0.50 であった。成犬用ウェット製品 B では、平均回収率は 103 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 6.4 %及び 16 %であり、HorRat は 0.73 であった。成猫用ウェット製品では、平均回収率は 93.7 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 4.9 %及び 10 %であり、HorRat は 0.68 であった。

ピリミホスメチルでの結果は Table 11 のとおりであり、成犬用ウェット製品 A では、平均回収率は 95.3 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（ RSD_f 及び RSD_R ）として 2.7 %及び 9.3 %であり、HorRat は 0.52 であった。成犬用ウェット製品 B では、平均回収率は 94.6 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 3.6 %及び 14 %であり、HorRat は 0.62 であった。成猫用ウェット製品では、平均回収率は 94.9 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 4.7 %及び 10 %であり、HorRat は 0.57 であった。

マラチオンでの結果は Table 12 のとおりであり、成犬用ウェット製品 A では、平均回収率は 93.4 %、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_f 及び RSD_R ）として 2.1 %及び 7.8 %であり、HorRat は 0.54 であった。成犬用ウェット製品 B では、平均回収率は 102 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 7.1 %及び 18 %であり、HorRat は 0.84 であった。成猫用ウェット製品では、平均回収率は 94.9 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 4.9 %及び 11 %であり、HorRat は

0.74 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の機種等を Table 13 に示した。

Table 10 Collaborative study results of Chlorpyrifos - methyl

Lab.No.	Pet food types					
	Wet type for dogs A (mg/kg)		Wet type for dogs B (mg/kg)		Wet type for cats (mg/kg)	
1	1.85	1.78	0.0558	0.0567	1.68	1.75
2	1.70	1.66	0.0359	0.0392	1.67	1.72
3	1.90	1.87	0.0560	0.0656	2.00	1.84
4	1.96	1.90	0.0531	0.0519	1.85	1.94
5	1.92	1.93	0.0468	0.0426	1.90	2.15
6	2.02	2.14	0.0538	0.0591	2.17	2.09
7	1.78	1.78	0.0536	0.0540	1.78	1.70
Spiked level (mg/kg)	2		0.05		2	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	1.87		0.0517		1.87	
Recovery ^{a)} (%)	93.5		103		93.7	
RSD _r ^{b)} (%)	2.3		6.4		4.9	
RSD _R ^{c)} (%)	7.0		16		10	
PRSD _R ^{d)} (%)	14		22		14	
HorRat	0.50		0.73		0.68	

a) $n=14$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 11 Collaborative study results of Pirimiphos-methyl

Lab.No.	Pet food types					
	wet type for dogs A (mg/kg)		wet type for dogs B (mg/kg)		wet type for cats (mg/kg)	
1	0.491	0.460	0.0551	0.0533	0.439	0.454
2	0.416	0.403	0.0352	0.0382	0.415	0.429
3	0.502	0.486	0.0515	0.0531	0.517	0.482
4	0.496	0.484	0.0454	0.0440	0.468	0.492
5	0.472	0.475	0.0427	0.0416	0.473	0.536
6	0.535	0.562	0.0471	0.0515	0.549	0.536
7	0.446	0.440	0.0527	0.0507	0.438	0.412
Spiked level (mg/kg)	0.5		0.05		0.5	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.476		0.0473		0.474	
Recovery ^{a)} (%)	95.3		94.6		94.9	
RSD _r ^{b)} (%)	2.7		3.6		4.7	
RSD _R ^{c)} (%)	9.3		14		10	
PRSD _R ^{d)} (%)	18		22		18	
HorRat	0.52		0.62		0.57	

a) $n=14$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 12 Collaborative study results of Malathion

Lab.No.	Pet food types					
	Wet type for dogs A (mg/kg)		Wet type for dogs B (mg/kg)		Wet type for cats (mg/kg)	
1	1.81	1.77	0.0544	0.0592	1.70	1.77
2	1.67	1.63	0.0351	0.0358	1.68	1.72
3	1.94	1.96	0.0586	0.0690	2.19	2.04
4	1.99	1.94	0.0488	0.0479	1.88	1.99
5	1.89	1.92	0.0488	0.0447	1.90	2.14
6	2.00	2.12	0.0466	0.0526	2.11	2.09
7	1.75	1.75	0.0556	0.0556	1.75	1.61
Spiked level (mg/kg)	2		0.05		2	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	1.87		0.0509		1.90	
Recovery ^{a)} (%)	93.4		102		94.9	
RSD _r ^{b)} (%)	2.1		7.1		4.9	
RSD _R ^{c)} (%)	7.8		18		11	
PRSD _R ^{d)} (%)	14		22		14	
HorRat	0.54		0.84		0.74	

a) $n=14$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 13 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	Gas chromatograph	GC column (i.d.×length, Filmthickness)
1	Agilent Technologies 6890	J&W DB-5 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm)
2	Agilent Technologies 6890N	J&W DB-5 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm)
3	Agilent Technologies 6890N	J&W DB-5 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm)
4	Agilent Technologies 6890N	J&W DB-5 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm)
5	Agilent Technologies 6890N	J&W HP-5 (0.25 mm i.d.×30 m,0.32 μm)
6	SHIMAZU GC-2010 Plus	J&W HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm)
7	Agilent Technologies 6890N	J&W DB-5 (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm)

4 まとめ

愛がん動物用飼料中のクロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンについて，分析センター法を基に，ガスクロマトグラフによる同時定量法の愛がん動物用飼料等の検査法への適用の可否について検討したところ，次の結果を得た．

- 1) クロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンの検量線は 0.05~5.0 ng 相当量（注入量として 0.05~5 ng）の範囲で直線性を示した．
- 2) ウェット製品中のクロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンの抽出は，抽出溶媒に酢酸エチルを用いることによりエマルジョンの発生を防止できた．また，自然汚染に近似させた試料を用いて酢酸エチルを使用することの妥当性を検討したところ，良好な結果が得られた．
- 3) ウェット製品中のクロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンをドライ法 A グループの測定条件を基にして検討したところ，3 成分同時測定が可能であった．
- 4) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの溶出画分の検討を行ったところ，流出液 2 mL 以降を分取することにより安定した回収率を得た．
- 5) 試験法の妥当性を確認するため犬用ウェット製品 2 種及び猫用ウェット製品 2 種にクロルピリホスメチル及びマラチオンとして 2 mg/kg，ピリミホスメチルとして 0.5 mg/kg 相当量添加し，添加回収試験を実施した結果，クロルピリホスメチルについては平均回収率 89.7~93.8%，その精度は相対標準偏差 (RSD) として 3.9% 以下，ピリミホスメチルについては平均回収率 80.8~88.5%，その精度は相対標準偏差 (RSD) として 5.1% 以下，マラチオンについては平均回収率 92.1~94.5%，その精度は相対標準偏差 (RSD) として 3.6% 以下の成績が得られた．
- 6) 本法による定量下限はクロルピリホスメチル，ピリミホスメチル及びマラチオンともに，試料（現物）中で 0.05 mg/kg，検出下限は 0.02 mg/kg であった．
- 7) 成犬用ウェット製品 A 及び成猫用ウェット製品にクロルピリホスメチルとして 2 mg/kg 相当量，ピリミホスメチルとして 0.5 mg/kg 相当量，マラチオンとして 2 mg/kg 相当量を，成犬用ウェット

製品 B にクロルピリホスメチル、ピリミホスメチル及びマラチオンとして各 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、7 試験室において本法に従い共同試験を実施した。その結果、クロルピリホスメチルにおいては、成犬用ウェット製品 A では、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相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 2.3 % 及び 7.0 % であり、HorRat は 0.50 であった。成犬用ウェット製品 B では、平均回収率は 103 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 6.4 % 及び 16 % であり、HorRat は 0.73 であった。成猫用ウェット製品では、平均回収率は 93.7 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 4.9 % 及び 10 % であり、HorRat は 0.68 であった。ピリミホスメチルにおいては、成犬用ウェット製品 A では、平均回収率は 95.3 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 2.7 % 及び 9.3 % であり、HorRat は 0.52 であった。成犬用ウェット製品 B では、平均回収率は 94.6 %、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 3.6 % 及び 14 % であり、HorRat は 0.62 であった。成猫用ウェット製品では、平均回収率は 94.9 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 4.7 % 及び 10 % であり、HorRat は 0.57 であった。マラチオンにおいては、成犬用ウェット製品 A では、平均回収率は 93.4 %、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 2.1 % 及び 7.8 % であり、HorRat は 0.54 であった。成犬用ウェット製品 B では、平均回収率は 102 %、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 7.1 % 及び 18 % であり、HorRat は 0.84 であった。成猫用ウェット製品では、平均回収率は 94.9 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 4.9 % 及び 11 % であり、HorRat は 0.74 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, 農薬ハンドブック 2005 年度版編集委員会編集: 農薬ハンドブック 2005 年度版
- 2) 農薬残留分析法研究班 (武田 明治, 小田中 芳次, 小松 一裕, 前川 吉明) 編: 最新 農薬の残留分析法 [改訂版], 中央法規出版, 359 (2006).
- 3) 農林水産省令・環境省令: 愛がん動物用飼料の成分規格等に関する省令, 平成 21 年 4 月 28 日, 農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 4) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知: 「愛がん動物用飼料等の検査法」の制定について, 平成 21 年 9 月 1 日, 21 消技第 1764 号 (2009).
- 5) 財団法人日本食品分析センター: 平成 21 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業 ペットフード中の有害物質の分析法の開発 (2009).

6 愛がん動物用飼料中のソルビン酸の液体クロマトグラフによる定量法

矢野 愛子*

Determination of Sorbic Acid in Pet Foods by LC

Aiko YANO*

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

An analytical method for sorbic acid in pet foods using liquid chromatography (LC) was developed. Sorbic acid was extracted from the sample with methanol. The extract was diluted and subjected to LC for determination of sorbic acid. The LC separation was carried out on an ODS column (L-column L-C18, 4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μm (Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan(CERI))) using 5 mmol/L citrate solution-acetonitrile-methanol (7:2:1) as a mobile phase. A recovery test was conducted using five kinds of pet foods (complete and balanced semi-dry type for adult dogs, complete and balanced dry type for adult dogs, that for adult cats, complete and balanced wet type for adult dogs and that for adult cats) spiked with 2,000 mg/kg (2,000 and 10 mg/kg for dry type for adult dogs and that for adult cats, 500 and 10 mg/kg for wet type for adult dogs and that for cats) of sorbic acid. The mean recoveries of sorbic acid were in the range of 92.6~99.4 % and the relative standard deviations (RSD) were within 3.0 %. A collaborative study was conducted at nine laboratories using complete and balanced semi-dry type for dogs, complete and balanced dry type for adult dogs and complete and balanced wet type for adult cats spiked with 1,000, 20 and 400 mg/kg of sorbic acid, respectively. The mean recovery of complete and balanced semi-dry type for dogs was 94.9 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 2.6 %, 4.6 % and 0.80, respectively. These values were 99.1 %, 0.8 %, 4.3 % and 0.42 for complete and balanced dry type for adult dogs and 92.5 %, 1.4 %, 2.7 % and 0.41 for complete and balanced wet type for adult cats, respectively.

Key words: additives ; sorbic acid ; pet food ; collaborative study

キーワード：添加物；ソルビン酸；愛がん動物用飼料；共同試験

1 緒 言

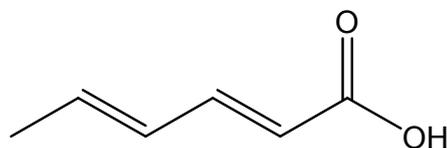
ソルビン酸はナナカマドの未熟な果実より発見された不飽和脂肪酸であり、カビ、酵母、好気性菌等の微生物に対して発育抑制作用を示す。加工食品の保存料としてソーセージ、かまぼこ、チーズなどに広く使用されており、食品中では使用基準¹⁾も設定されている。しかし、国内では飼料及び愛がん動物用飼料での使用基準等は定められていない。

ソルビン酸の定量法としては、財団法人日本食品分析センターが、平成 21 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業において開発した方法²⁾（以下「分析センター法」という。）がある。

* 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

今回、この分析センター法を基に、愛がん動物用飼料等の検査法³⁾への適用の可否について検討した。その概要を報告する。

なお、ソルビン酸の構造式を Fig.1 に示した。



Sorbic acid

(2,4-Hexadienoic acid)

C₆H₈O₂ MW: 112.1

CAS No.: 110-44-1

Fig.1 Chemical structure of Sorbic acid

2 実験方法

2.1 試料

愛がん動物用飼料成犬用ドライ製品，成犬用セミドライ製品，成犬用ウェット製品，成猫用ドライ製品，成猫用ウェット製品を，ドライ製品及びセミドライ製品についてはそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉砕し，ウェット製品はフードプロセッサーで粉砕して供試試料として用いた。それぞれに表示されていた原材料を Table 1 に示した。

Table 1 Ingredients list of pet foods

Pet food types	Ingredients
Dry type for adult dogs	Grains (Corn, Wheat, Corn gluten feed, Wheat bran, Soybean meal, Corn gluten meal, Defatted rice bran), Meat(Chicken meal, Chicken extract, Breast meat powder, Beef powder), Vegetables (Beet pulp, Spinach, Carrot, Pumpkin), Animal fat, Bean(Defatted soybean, Soybean extract), Fish(Fish meal, Dried fish), Roast linseed, Coloring agents (Titanium dioxide, Red-102, Red-106, Yellow-4, Yellow-5 Blue-1), Vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D, E, K, Choline, Niacin, Pantothenate, Biotin, Folic acid), Minerals (Cl, Co, Cu, Fe, I, K, Mn, Zn), Antioxidants (Mixed tocopherol, Herb extracts)
Semi-dry type for adult dogs	Grains (Corn, Wheat), Meat (Chicken meal, Breast meat powder), Sugar(High-fructose corn syrup, Oligosaccharide), Animal fat, Beer yeast, Vegetables (Beet pulp, Spinach, Carrot, Pumpkin), Soybean meal, Herb, Dried small fish, Propyleneglycol, Emulsifier, Preservative (Potassium sorbate), Minerals (Cl, Cu, I, K, Zn), Malic acid, Vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D, E, K, Choline, Pantothenate), Glucosamine hydrochloride, Coloring agents(Titanium dioxide, Red-106, Yellow-4, Yellow-5 Blue-1), Chondroitin sulfate, Antioxidants (Mixed tocopherol, Herb extracts)
Wet type for adult dogs	Meat (Chicken), Vegetables, Vitamins (E, A, B ₁), Minerals (K, Ca, Zn, S), Polysaccharide, Coloring agents (Titanium dioxide), pH regulator, Coloring agent (Sodium nitrite)
Dry type for adult cats	Grains, Plant protein extracts, Fish (Tuna, Salmon), Meat (Chicken, Chicken liver), Animal fat, Minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), Vitamins (A, D, E, K, B ₁ , B ₂ , Pantothenate, Niacin, B ₆ , Folic acid, Biotin, B ₁₂ , Choline, Taurine, C), Methionine, Coloring agents(Red-102, Red-106, Yellow-4, Yellow-5), Antioxidants (Mixed tocopherol)
Wet type for adult cats	Fish (Bonito, Tuna, Boiled fish paste, Crab extract), Starch, Oligosaccharide, Minerals, Vitamins, Monascus color, Carminic acid, Spice

2.2 試薬

1) ソルビン酸標準液

ソルビン酸標準品（関東化学製，純度 100.0 %）100 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてソルビン酸標準原液を調製した（この液 1 mL は，ソルビン酸として 1 mg ($f=1.000$) を含有する．）．

使用に際して，標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し，1 mL 中にソルビン酸として 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 及び 100 μg を含有する各標準液を調製した．

2) 5 mmol/L クエン酸溶液

クエン酸一水和物 0.7 g とクエン酸三ナトリウム二水和物 0.6 g に水を加え溶かして 1,000 mL とした．

3) メタノール，アセトニトリルは液体クロマトグラフ用を用いた．その他，特記している以外の試薬は特級を用いた．

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ：Agilent Technologies 製 1100series

2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

3) 遠心分離機：久保田製作所製 5100

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

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，メタノール 100 mL を加え，15 分間振り混ぜて抽出した．抽出液を 10 mL の共栓遠心沈殿管に入れ，2,000 $\times g$ (3,800 rpm) で 10 分間遠心分離した．上澄み液の一定量をメタノールで正確に 10 倍希釈し，メンブランフィルター（孔径 0.45 μm 以下）でろ過し，液体クロマトグラフによる測定に供する試料溶液とした．

2) 液体クロマトグラフィー

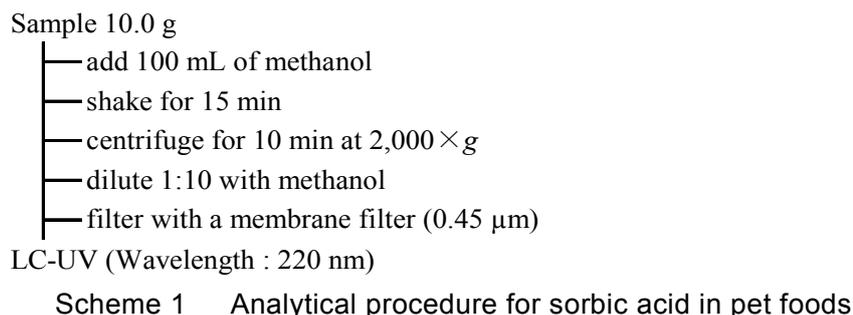
試料溶液及び各ソルビン酸標準液各 10 μL を液体クロマトグラフに注入し，Table 2 の測定条件に従ってクロマトグラムを得た．

3) 計算

得られた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，試料中のソルビン酸量を算出した．なお，定量法の概要を Scheme 1 に示した．

Table 2 Operating conditions of LC for sorbic acid

Column	CERI L-column L-C18 (4.6 mm i.d. \times 150 mm, 5 μm)
Mobile phase	5 mmol/L citrate solution-acetonitrile-methanol (7:2:1)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	UV detector (Wavelength: 220 nm)
Column temperature	40 $^{\circ}\text{C}$



3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 1)に従って調製した標準液各 10 μL を液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成した。Fig. 2 に示したように、検量線はソルビン酸として 0.05~100 μg/mL (注入量として 0.5~1,000 ng) の範囲で直線性を示した。

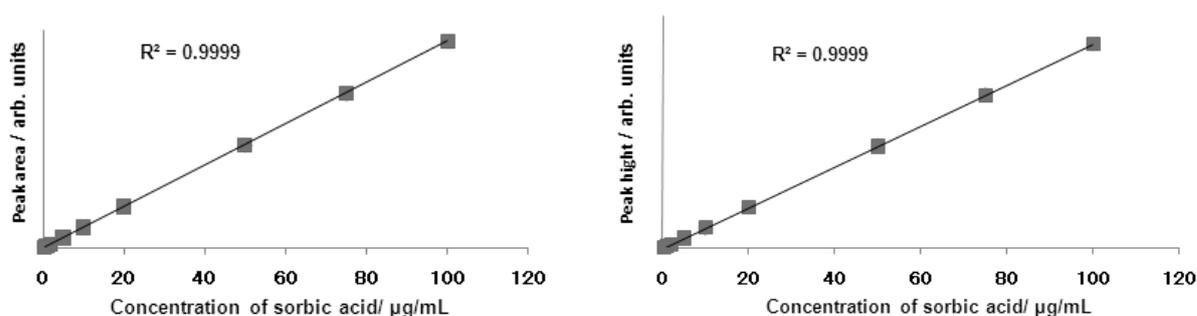


Fig. 2 Calibration curves of Sorbic acid by peak area (left) and peak height (right)

3.2 抽出方法の検討

分析センター法ではホモジナイズ抽出と振とう抽出を併用しているが、作業の省力化の観点から、飼料分析基準⁴⁾で汎用されている振とう抽出法が適用可能か否かについて検討した。

2.1 で調製した成猫用ドライ製品にソルビン酸として 5,000 mg/kg 相当量、成犬用ウェット製品にソルビン酸として 1,000 mg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料を用いて分析センター法及び本法により 5 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。その結果を Table 3 に示したが、本法による添加回収試験結果は分析センター法と同等以上であった。

また、ソルビン酸が添加されている市販の犬用セミドライ製品 5 製品を試料として用い、分析センター法及び本法に従って抽出し試料中のソルビン酸含量を求めた。その結果、Table 4 のとおり、分析値に有意な差は認められなかった。

以上の結果から、本法による抽出法を採用することとした。

Table 3 Recoveries of sorbic acid by two methods

Method	Pet food types (Spiked level)			
	Dry type for adults cats (5,000 mg/kg)		Wet type for adults dogs (1,000 mg/kg)	
	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)
Method of JFRL ^{c)}	93.0	2.7	91.8	4.1
This method	95.9	1.1	91.8	0.7

a) Mean ($n=5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Japan Food Research Laboratories

Table 4 Quantitative value of sorbic acid by two methods

Pet food types	This method (mg/kg)	Method of JFRL (mg/kg)
Semi-dry type for adult dogs 1	3,590	3,680
Semi-dry type for adult dogs 2	3,200	3,250
Semi-dry type for dogs 1	900	910
Semi-dry type for dogs 2	1,850	1,850
Semi-dry type for dogs 3	1,100	1,170

3.3 妨害物質の検討

市販の愛がん動物用飼料（成犬用ドライ製品 1 種類，成犬用ウェット製品 2 種類，成猫用ドライ製品 2 種類，成猫用ウェット製品 3 種類）を用い，本法に従って調製した試料溶液を液体クロマトグラフに注入し，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．セミドライ製品については，通常，ソルビン酸が添加されていることから，検討を行わなかった．

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

3.4 添加回収試験

2.1 で調製した成犬用ドライ製品、成猫用ドライ製品にソルビン酸として 2,000 及び 10 mg/kg 相当量、成犬用ウェット製品及び成猫用ウェット製品にソルビン酸として 500 及び 10 mg/kg 相当量、セミドライ製品にソルビン酸として 2,000 mg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料を用いて、本法により 5 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。なお、セミドライ製品については試料のブランク値を求めて補正を行った。

結果を Table 5 に示した。平均回収率 92.6~99.4 %，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 3.0 %以下の成績が得られた。

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(C)に示した。

Table 5 Recoveries of sorbic acid from five kinds of pet foods

Spiked level (mg/kg)	Pet food types									
	Dry type for adult dogs		Dry type for adult cats		Semi-dry type for adult dogs		Wet type for adult dogs		Wet type for adult cats	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
2,000	97.1	1.1	98.7	2.6	97.8	2.1	–	–	–	–
500	–	–	–	–	–	–	92.6	1.6	94.8	0.7
10	99.4	3.0	97.5	1.3	–	–	95.3	1.3	96.8	0.9

a) Mean ($n=5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

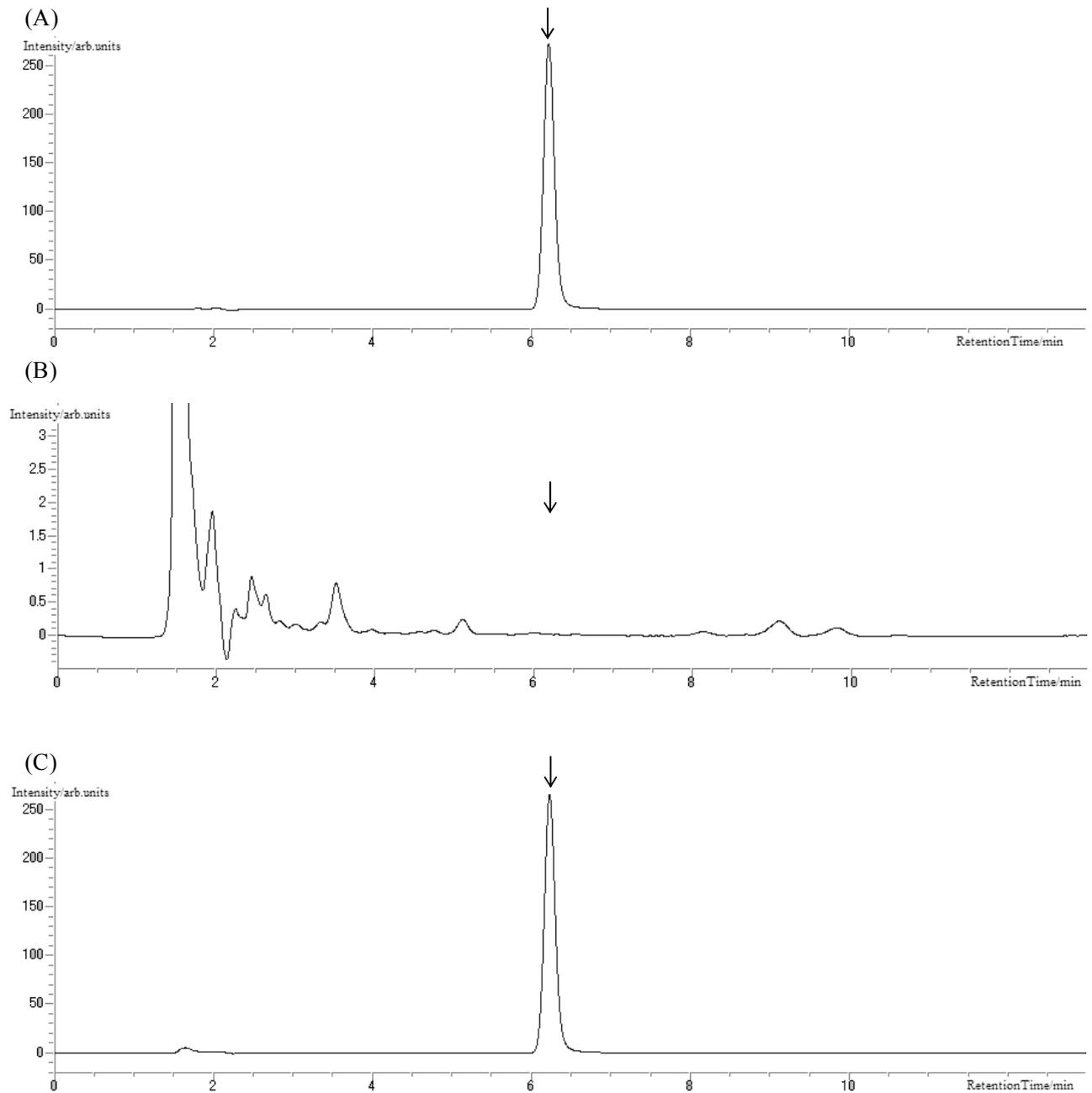


Fig. 3 Chromatograms of sorbic acid and blank solution

LC conditions are shown in Table 2.

(A) Standard solution of sorbic acid (The amount is 200 ng)

(B) Sample solution of complete and balanced dry type for adult dogs (not spiked)

(C) Sample solution of complete and balanced dry type for adult dogs spiked with 2,000 mg/kg of sorbic acid

(Arrows indicate the retention time of sorbic acid.)

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、成犬用ドライ製品にソルビン酸を添加し、添加

回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 になる濃度を求めた。

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

確認のために、成犬用ドライ製品、成猫用ドライ製品、成犬用ウェット製品及び成猫用ウェット製品にソルビン酸として 10 mg/kg 相当量を添加した試料について、本法により 5 点併行で定量を行った結果は Table 5 のとおりであり、平均回収率は 99.4, 97.5, 95.3 及び 96.8 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 3.0, 1.3, 1.3 及び 0.9 % であった。

また、 SN 比が 3 となる濃度は 3 mg/kg であった。

以上の結果から、本法の定量下限は 10 mg/kg, 検出下限は 3 mg/kg であった。

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。

全成長段階犬用セミドライ製品にソルビン酸として 1,000 mg/kg 相当量, 成犬用ドライ製品にソルビン酸として 20 mg/kg 相当量, 及び成猫用ウェット製品にソルビン酸として 400 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて, 株式会社日清製粉グループ本社 QE センター, 日本ハム株式会社中央研究所, 財団法人日本食品分析センター多摩研究所, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 同札幌センター, 同仙台センター, 同名古屋センター, 同神戸センター及び同福岡センター (計 9 試験室) において本法に従って共同試験を実施した。

その結果を Table 6 に示した。全成長段階犬用セミドライ製品では平均回収率は 94.9 %, 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 2.6 % 及び 4.6 % であり, HorRat は 0.80 であった。成犬用ドライ製品では平均回収率は 99.1 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 0.8 % 及び 4.3 % であり, HorRat は 0.42 であった。成猫用ウェット製品では, 平均回収率は 92.5 %, 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 1.4 % 及び 2.7 % であり, HorRat は 0.41 であった。

参考のため, 各試験室で使用した液体クロマトグラフの機種等を Table 7 に示した。

Table 6 Collaborative study results of Sorbic Acid

Lab.No.	Semi-dry type for dogs		Dry type for adults dogs		Wet type for adults cats	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	883	919	19.2	19.3	363	364
2	922	930	18.3	17.9	355	365
3	967	977	20.4	20.2	380	383
4	923	921	19.7	19.7	364	365
5	960	970	19.7	19.7	355	372
6	966	950	20.4	20.8	377	380
7	1,040	1,030	20.4	20.3	363	368
8	911	956	20.6	20.4	382	383
9	885	969	18.7 ^{e)}	21.0 ^{e)}	346 ^{e)}	388 ^{e)}
Spiked level (mg/kg)	1,000		20		400	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	949		19.8		370	
Recovery ^{a)} (%)	94.9		99.1		92.5	
RSD _r ^{b)} (%)	2.6		0.8		1.4	
RSD _R ^{c)} (%)	4.6		4.3		2.7	
PRSD _R ^{d)} (%)	5.7		10		6.6	
HorRat	0.80		0.42		0.41	

- a) Semi-dry type for adult dogs: $n=18$, Dry type for adult dogs and wet type for adult cats: $n=16$ (without Lab. No. 9)
- b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
- c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
- d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation
- e) Data excluded by Cochran test

Table 7 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	Instruments	LC column (i.d.× length, particle size)
1	Agilent Technologies LC-1100 Series	Chemicals Evaluation and Research Institute L-column L-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)
2	HITACHI L-7000	GL Sciences Inertsil ODS-3V (4.6×150 mm, 5 μm)
3	Agilent Technologies LC-1100 Series	Chemicals Evaluation and Research Institute L-column L-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)
4	Agilent Technologies LC-1100 Series	Shiseido CAPCELL PAK C18 (4.6×150 mm, 5 μm)
5	Agilent Technologies LC-1100 Series	KANTO Chemical Mightysil RP-18 GP (4.6×150 mm, 5 μm)
6	Hewlett Packard HP 1100 series	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)
7	Waters Waters 2487	Shiseido CAPCELL PAK C18 (4.6×150 mm, 3 μm)
8	Agilent Technologies LC-1100 Series	Showa Denko Shodex C18M4E (4.6×250 mm, 5 μm)
9	Shimadzu Prominence	KANTO Chemical Mightysil RP-18GP (4.6×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

愛がん動物用飼料に添加されているソルビン酸について、分析センター法を基に、液体クロマトグラフを用いた定量法の愛がん動物用飼料等の検査法への適用の可否を検討したところ、次の結果を得た。

- 1) 検量線はソルビン酸として 0.05~100 μg/mL (注入量として 0.5~1,000 ng) の範囲で直線性を示した。
- 2) 15 分間振とう抽出した結果、良好に測定が可能であった。
- 3) 市販の愛がん動物用飼料 (成犬用ドライ製品 1 種類, 成犬用ウェット製品及び成猫用ドライ製品各 2 種類並びに成猫用ウェット製品 3 種類) について本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、ソルビン酸の定量を妨げるピークは認められなかった。
- 4) 成犬用ドライ製品及び成猫用ドライ製品にソルビン酸として 2,000 及び 10 mg/kg 相当量, 成犬用ウェット製品及び成猫用ウェット製品にソルビン酸として 500 及び 10 mg/kg 相当量並びに成犬用セミドライ製品にソルビン酸として 2,000 mg/kg 相当量をそれぞれ添加し、本法に従って添加回収試験を実施したところ、平均回収率は 92.6~99.4 %, その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 3.0 %以下の成績が得られた。
- 5) 本法によるソルビン酸の定量下限は試料中で 10 mg/kg, 検出下限は 3 mg/kg であった。
- 6) 全成長段階犬用セミドライ製品, 成犬用ドライ製品及び成猫用ウェット製品に、ソルビン酸として 1,000, 20 及び 400 mg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料を用いて、9 試験室において本法に従い共同試験を実施した。その結果、全成長段階犬用セミドライ製品では平均回収率は 94.9

%, 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_f 及び RSD_R) として 2.6 %及び 4.6 %であり, HorRat は 0.80 であった. 成犬用ドライ製品では, 平均回収率は 99.1 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 0.8 %及び 4.3 %であり, HorRat は 0.42 であった. 成猫用ウェット製品では, 平均回収率は 92.5 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 1.4 %及び 2.7 %であり, HorRat は 0.41 であった.

謝 辞

共同試験に参加していただいた株式会社日清製粉グループ本社 QE センター, 日本ハム株式会社中央研究所, 財団法人日本食品分析センター多摩研究所の試験室の各位に感謝の意を表します.

文 献

- 1) 厚生省告示: 食品, 添加物等の規格基準, 昭和 34 年 12 月 28 日, 告示第 370 号 (1959).
- 2) 財団法人日本食品分析センター: 平成 21 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業ペットフード中の有害物質の分析法の開発 (2009).
- 3) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知: 「愛がん動物用飼料等の検査法」の制定について, 平成 21 年 9 月 1 日, 21 消技第 1764 号 (2009).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知: 飼料分析基準の制定について, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).

技術レポート

1 ライグラス中のロリトレム B の液体クロマトグラフによる定量法の改良

細貝 明理*

Improved Determination Method of Lolitrem B in Ryegrass by LC

Ari HOSOKAI*

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

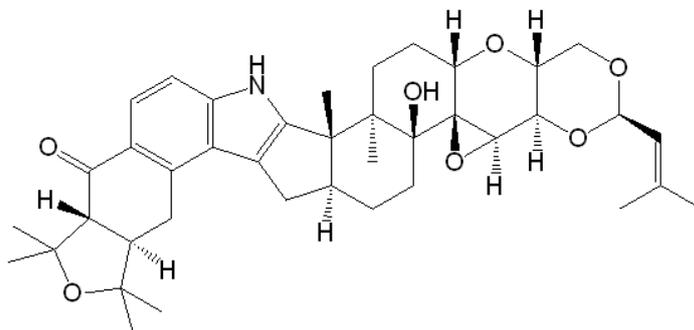
1 緒 言

ロリトレム B はイネ科植物内に共生する微生物である *Neotyphodium lolii* がライグラスわらに感染して産生する生理活性物質のひとつであり、ライグラススタグー等の家畜中毒を引き起す神経毒素として知られている。米国オレゴン州立大学の報告¹⁾によると、ロリトレム B の家畜に対する危険値は、1,800~2,000 ppb とされているが、国内で報告されるロリトレム B によると思われる中毒事例は 1,800 ppb 以下でも見受けられており、品種や年齢、性別など個体により感受性が異なると言われている²⁾。

現在、我が国におけるライグラスわら中のロリトレム B の定量法は、小野らが検討した LC 法³⁾が飼料分析基準⁴⁾に収載されている。しかし、米国の定量法が我が国の定量法と異なり、米国の定量法で得られたロリトレム B の定量値が日本での定量値よりも高くなる事例が見られたことから、抽出方法の改良を中心として日米共同で検討していくこととなった。

なお、ロリトレム B の構造式を Fig. 1 に示した。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部



Lolitreum B

 $C_{42}H_{55}NO_7$ MW: 685.89

CAS No.: 81771-19-9

Fig. 1 Chemical structure of Lolitreum B

2 実験方法

2.1 試料

ペレニアルライグラスわら及びイタリアンライグラスわらをそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕し、供試試料とした。

2.2 試薬等

1) ロリトレム B 標準液

ロリトレム B 標準品（和光純薬工業製，純度 98.0 %）1.3 μg を正確に量り，ジクロロメタン-アセトニトリル（4+1）1 mL を正確に加えて溶かし，ロリトレム B 標準原液を調製した（この液 1 mL はロリトレム B として 1,300 ng ($f=0.980$) を含有する．）。

使用に際して，標準原液の一定量をジクロロメタン-アセトニトリル（4+1）で正確に希釈し，1 mL 中にロリトレム B として 2.08, 5.2, 10.4, 52.0 及び 104.0 ng を含有する各ロリトレム B 標準液を調製した。

2) アセトニトリル，ジクロロメタン及び蒸留水は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) 液体クロマトグラフ：Agilent Technologies 製 1100 Series
- 2) 振とう機：TAITEC 製 Water Bath Shaker XY-80
- 3) ロータリーエバポレーター：BÜCHI 製 R-200
- 4) シリカゲルミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Silica cartridge（充てん剤量 690 mg）にリザーバーを連結したもの
- 5) メンブランフィルター：関東化学製 HLC-DISK13 溶媒系（孔径 0.45 μm ，直径 13 mm，PTFE）

2.4 定量方法

定量操作は遮光した状態で行った。

1) 抽出

分析試料 1 g を正確に量って 50 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、酢酸エチル-メタノール-ヘキサン (4+3+2) 20 mL を加えた後、18 時間ゆるやかに横に振り混ぜて抽出した。

抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過し、ろ液 5 mL を正確に 50 mL のなす形フラスコに入れ、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

ヘキサン-酢酸エチル (9+1) 5 mL を正確に加えて残留物を溶かした後、メンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

シリカゲルミニカラムをヘキサン-酢酸エチル (9+1) 2 mL で洗浄した。

試料溶液 2 mL を正確にミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させ、更にヘキサン-酢酸エチル (9+1) 5 mL を加えて同様に流出させた。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-酢酸エチル (7+3) 6 mL を加えてロリトレム B 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。

ジクロロメタン-アセトニトリル (4+1) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各ロリトレム B 標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、Table 1 の測定条件に従ってクロマトグラムを得た。

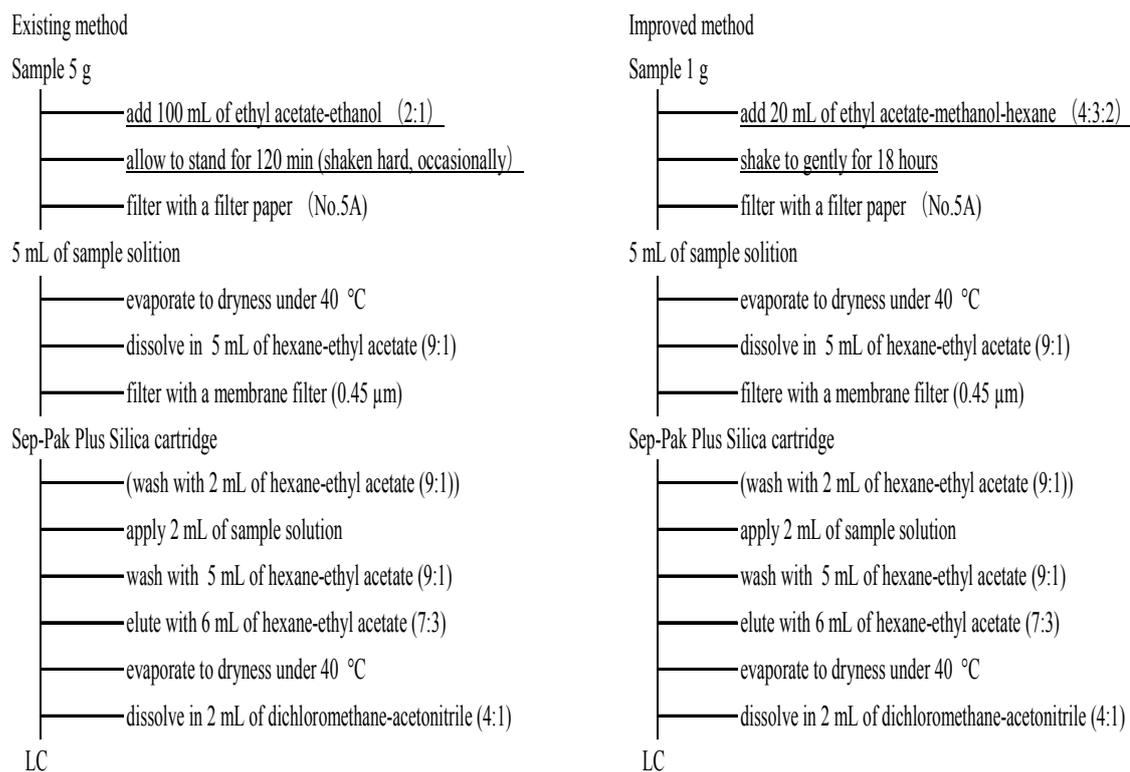
Table 1 Operating conditions of LC for analyzing Lolitrem B

Column	Agilent Technologies ZORBAX SIL (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm)
Mobile phase	dichloromethane-acetonitril-water (200:50:1)
Flow rate	0.5 mL/min
Detector	Fluorescence detector (Ex:268 nm, Em:440 nm)
Column temperature	40 °C

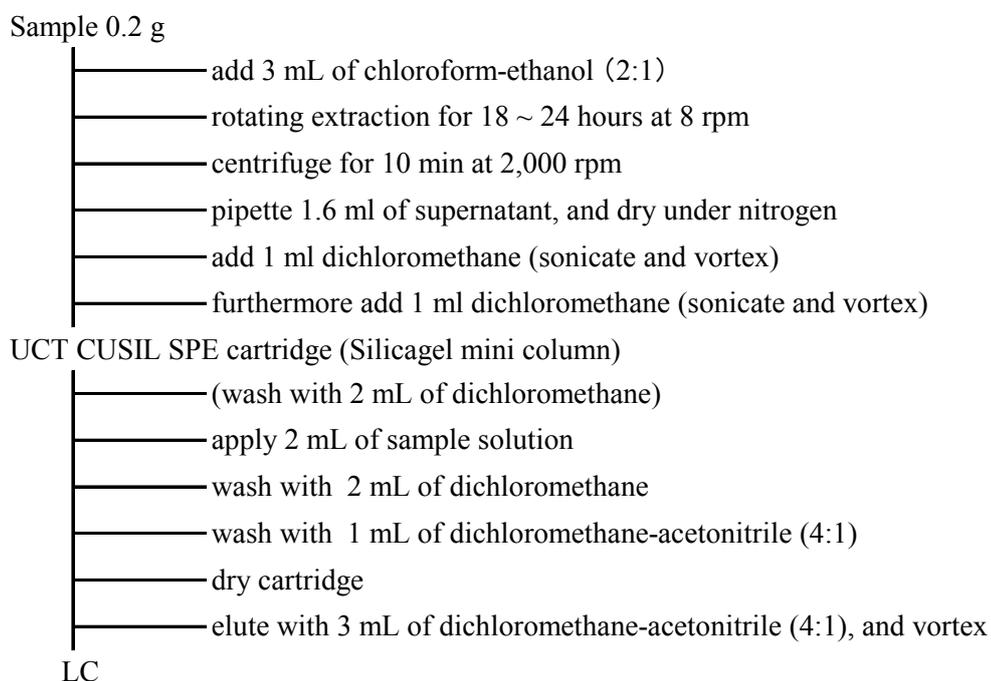
4) 計算

得られたクロマトグラムからピーク高さを求めて検量線を作成し、試料中のロリトレム B 量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。また、参考までに、米国の定量法の概要を Scheme 2 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure of existing and improved method of Lolitrem B in ryegrass in japan



Scheme 2 Analytical procedure of Lolitrem B in ryegrass in oregon

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

2.2 の 1)に従って調製した標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムからピーク高さを求めて検量線を作成した。その結果、Fig. 2 のとおり、検量線は 2.08~104 ng/mL (注入量として 0.0416~2.08 ng) の範囲で直線性を示した。

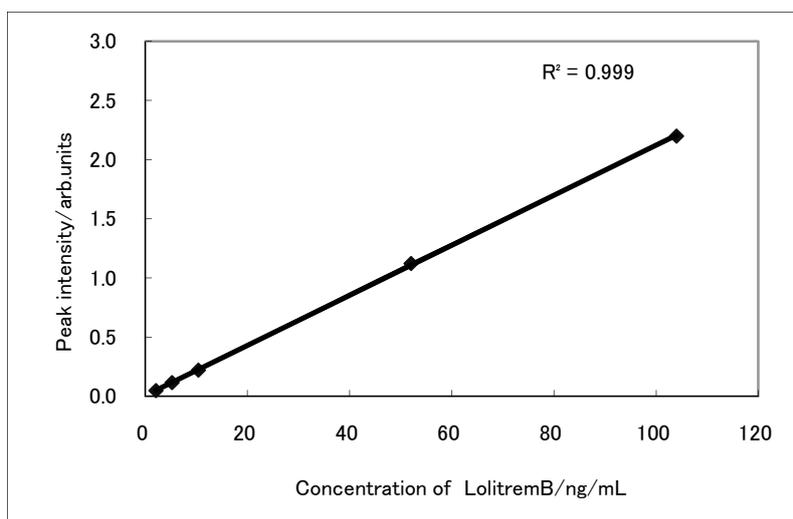


Fig. 2 Calibration curve of Lolitrem B

3.2 抽出液の検討

飼料分析基準収載法⁴⁾ (以下「現行法」という.) では、抽出液に酢酸エチル-エタノール (2+1) が採用されている。一方、オレゴン州立大学の方法 (以下「オレゴン大法」という.) を Scheme 2 に示した。オレゴン大法では、抽出液にクロロホルム-メタノール (2+1) を用いている。小野ら³⁾が現行法を検討した際には、分析者への健康影響を考慮しクロロホルムに代えて酢酸エチルを採用しているが、この抽出液ではロリトレム B が十分に抽出されず、そのことが両法間の定量値の差に影響しているものと考えられた。

そこで、オレゴン大法の抽出液であるクロロホルム-メタノール (2+1) を基にして、抽出液をオレゴン大の提案に準じて、クロロホルムの代わりにヘキサン-酢酸エチル (1+2) を用い、酢酸エチル-メタノール-ヘキサン (4+3+2) (以下「改良抽出液」という.) に変更して、以下現行法に従って定量を行い、現行法との定量値を比較した。

試料には、自然汚染されたライグラスわらを用いた。

その結果、Table 2 のとおり、イタリアン及びペレニアルライグラスわらのいずれの試料においても、改良抽出液では現行法の抽出液に対して 10~20 %の定量値の増加が見られた。このことから今後の検討では改良抽出液を使用することとした。

Table 2 Comparison of quantitative value of Lolitrem B by extraction solvents

kind of ryegrass	existing extraction solvent		new extraction solvent	
	Value ^{a)}	RSD ^{b)}	Value ^{a)}	RSD ^{b)}
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)
Italian	1344	3.3	1626	0.3
Perennial	2146	1.0	2455	1.1

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.3 抽出方法及び抽出時間の検討

次に、抽出時間及び抽出方法について検討を行った。

現行法では 1 時間に 3~4 回激しく振り混ぜながら 2 時間静置して抽出を行っている。これに対し、オレゴン大法では 18~24 時間のゆるやかな振とうにより抽出している。このことから、18 時間ゆるやかに振とうした抽出法と現行の抽出法を比較するため、それぞれの抽出法で抽出し、以降現行法に従って定量を行った。なお、18 時間ゆるやかに振とうするにあたり 100 rpm で振とうを行った。

その結果、Table 3 のとおり、ロリトレム B の回収率は 18 時間ゆるやかな振とう抽出を行った場合、現行法に対し 6 %の定量値の増加が得られた。このことから今後の検討では、18 時間ゆるやかに振とうした抽出方法で検討を行うこととした。

Table 3 Comparison of quantitative value of Lolitrem B by extraction methods and times

kind of ryegrass	existing extraction method (2hours)		new extraction method (18hours)	
	Value ^{a)}	RSD ^{b)}	Value ^{a)}	RSD ^{b)}
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)
Italian	1626	0.3	1737	0.4
Perennial	2455	1.1	2612	0.8

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.4 試料採取量の検討

試料の採取量については現行法では 5 g としている。しかし、平成 10 年度有害物質等残留防止緊急事業において財団法人日本食品分析センターが検討した分析法⁵⁾では 1 g、オレゴン大法では 0.2 g で分析を行っている。このことから、採取量の影響を調べるため、自然汚染された試料を用いて次の検討を行った。

自然汚染された試料 0.5 g に対して 10 mL, 1 g に対して 20 mL, 5 g に対して 100 mL の改良抽出液を用いて 18 時間ゆるやかに振とう抽出し、以下現行法に従って分析値を求めた。

その結果、Table 4 のとおり、平均定量値に特に差は認められなかった。相対標準偏差 (RSD) は試料採取量が多くなるにつれて小さくなる傾向はあるものの、いずれも問題があると認められる値ではなかった。これらのことから、分析操作の簡便性を考慮して 1 g を採用することにした。

Table 4 Comparison of quantitative value of Lolitrem B by sampling weights

sampling weight	0.5 g		1 g		5 g	
	Value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD ^{b)} (%)	Value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD ^{b)} (%)	Value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD ^{b)} (%)
infected ryegrass						
high concentration	1981	3.7	1955	3.9	1987	0.5
low concentration	48	2.3	49	3.1	48	0.4

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.5 シリカゲルミニカラムの検討

ロリトレム B について、シリカゲルミニカラムからの溶出画分の検討を行った。

2.4 の 1) に従ってライグラスわらから抽出した抽出液 5 mL に対して、ロリトレム B として 520 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量添加し、2.4 の 2) に従ってカラム処理を行った。

ミニカラムからの各溶出画分をそれぞれ分取し、これらを減圧濃縮、乾固後、残留物をジクロロメタン-アセトニトリル (4+1) に溶かしたものを液体クロマトグラフによる測定に供試した。

Table 5 に示したように、ロリトレム B はヘキサン-酢酸エチル (7+3) 0~6 mL に溶出し、洗浄液には溶出されなかった。以上の結果から、本法では現行法³⁾と同様にヘキサン-酢酸エチル (7+3) 6 mL で溶出することとした。

Table 5 Elution pattern of Lolitrem B from silicagel mini column

	Hexane-ethylacetate (9+1)		Hexane-ethylacetate (7+3)					Total
	0~5 mL	0~1 mL	1~2 mL	2~3 mL	3~4 mL	4~5 mL	5~6 mL	
			0	0	37	49	13	
Recovery ^{a)} (%)	0	0	0	37	49	13	0	99

a) $n=1$

3.6 添加回収試験

2.1 で調製したライグラスわらにロリトレム B として 390, 260, 130 及び 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用いて、本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。添加回収試験については、ロリトレム B の汚染が認められないライグラスわらが入手できなかったことから、試料として汚染程度の低いライグラスわらを用い、回収率は定量値からブランク値を差し引いて求めた。

Table 6 に示したように、平均回収率 78.7~109 %, その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 11 % 以下の成績が得られた。

なお、クロマトグラムの一例を Fig.3 に示した。

Table 6 Recoveries of Lolitrem B from ryegrass

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ryegrass	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
390	108	0.5
260	107	2.3
130	109	3.7
50	78.7	11

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

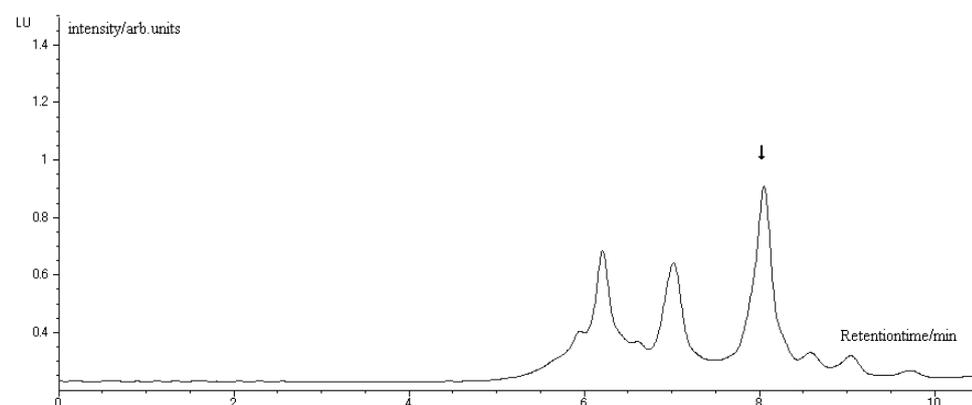
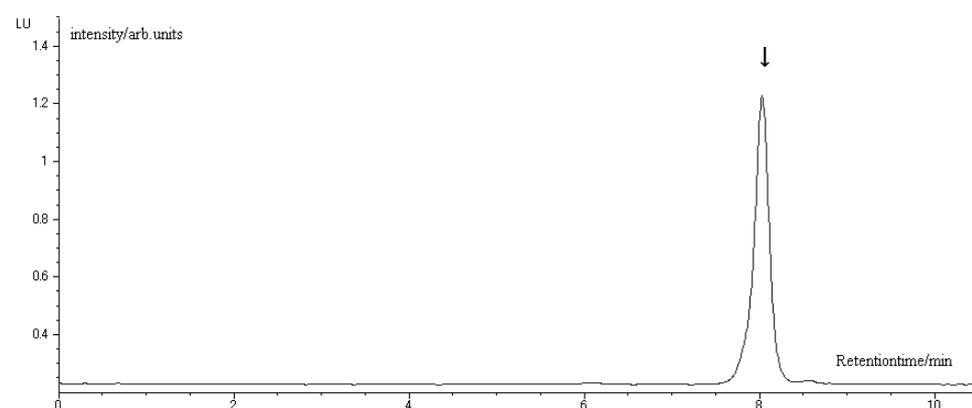


Fig.3 LC chromatograms of Lolitrem B

LC conditions are shown in Table 1.

a) Standard solution (The amount of lolitremB is 1.3 ng.)

b) Sample solution of ryegrass Spiked lolitremB at 770 $\mu\text{g}/\text{kg}$

(\(\downarrow\) : Arrows indicate the peak of lolitremB.)

4 まとめ

ライグラスわら中のロリトレム B について、液体クロマトグラフを用いた定量法の改良を検討したところ、次の結果を得た。

- 1) 検量線は、ロリトレム B について 0.04~2.04 ng の範囲で直線性を示した。
- 2) 抽出液に酢酸エチル-メタノール-ヘキサン (4+3+2) を採用したところ、良好な結果が得られた。
- 3) 18 時間ゆるやかに振り混ぜて抽出することで良好な結果が得られた。
- 4) 試料採取量について 5, 1 及び 0.5 g を比較した結果、1 g を採用することにした。
- 5) ミニカラムからの溶出画分の検討を行ったところ、現行法と同様に 6 mL で溶出することとした。
- 6) ライグラスわらに、ロリトレム B として 390, 260, 130 及び 50 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて、添加回収試験を実施したところ、平均回収率 78.7~109 %, その繰り返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 11 %以下の成績が得られた。
- 7) 今後、本法での定量下限及び検出下限の検討等並びに共同試験を実施する予定である。

文 献

- 1) S.Aldrich-Markham, G.Pirelli, A.M.Craig: Oregon State University Extension Service EM8598-E · Revised (2007).
- 2) Shigeru Miyazaki, Megumi Fukumura, Miyako Yoshioka, Noriko Yamanaka: Detection of Endophyte Toxins in the Imported Perennial Ryegrass Straw, *J. Vet. Med. Sci.*, **63**(9), 1013-1015 (2001).
- 3) 小野雄三, 染谷潔, 古川明, 菅野清: 高速液体クロマトグラフィーによるライグラス中のロリトレム B の定量, *飼料研究報告*, **25**, 12-20 (2000).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知: 飼料分析基準の制定について, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) 財団法人日本食品分析センター: 平成 10 年度有害物質等残留防止緊急対策事業 飼料中の抗菌性飼料添加物等の分析法の開発, (1999).

技術レポート**2 飼料中の牛由来たん白質検出法における「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2」の検討**武田 然也^{*1}, 橋本 仁康^{*2}, 山本 貴之^{*3}**Assessment of Morinaga ELISA Kit Ver.2 Detecting Bovine Protein in Feeds**Zenya TAKEDA^{*1}, Yoshiyasu HASHIMOTO^{*2} and Takayuki YAMAMOTO^{*3}<sup>(^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department,
(Now Nagoya Regional Center),</sup>^{*2 Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department}^{*3 Morinaga Institute of Biological Science, Inc.)}**1 緒 言**

日本で牛海綿状脳症（BSE）の発生が確認されて以来、BSE の感染拡大を防止するために、動物性たん白質の飼料への利用が規制され、対象家畜の種類により利用できる動物性たん白質原料の種類が規定されている^{1),2)}。このため、飼料分析基準³⁾では、検出方法として、顕微鏡鑑定法、PCR 法及び ELISA 法の 3 つを用い、各試験法の結果を総合的に判断して判定を行っている。これらの試験法のうち、ELISA 法では、市販の動物種別たん白質検出キットである ELISA Technologies 製「MELISA-TEK RUMINANT KIT for MEAT & BONE MEALS and ANIMAL FEED」（以下「メライザキット」という。）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」（以下「モリナガキット」という。）が定められている³⁾。ただしこれらのキットは、反応性の違いから、検査の対象飼料の適用範囲が限られているため（Table 1）、適用範囲の拡大が求められてきたところである。

森永生科学研究所で新たに開発された「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2」（以下「モリナガキット Ver.2」という。）は、骨格筋中のウシミオグロビンと特異的に反応するモノクローナル抗体を用いた定性試験キットである（Table 2）。そのため、植物性飼料原料、乳製品、牛以外の動物由来たん白質には反応しないことが期待されたことから、各種飼料への適用の可否を検討し、動物由来たん白質検出法としての有用性を確認することとした。

今回、モリナガキット Ver.2 の有用性を確認するために、配合飼料 3 点、植物性飼料原料 22 点及び動物性飼料原料 37 点を用いた特異性確認試験、6 点の配合飼料及び飼料原料中の牛肉骨粉の検出下限の検討及びキットの安定性に関する検討を行ったのでその概要を報告する。

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 同名古屋センター^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部^{*3} 株式会社森永生科学研究所

Table 1 Applicability of three ELISA kits

Feed	(A/NA : Applicable/Not Applicable)		
	Analysis		
	Bovine	Bovine	Ruminant
	Morinaga Ver.2	Morinaga ^{a)}	MELISA ^{b)}
Formula feed	A	A	NA
Fish meal	A	A	NA
Poultry by-product meal, blood meal	Poultry	NA	A
	Swine or horse	NA	A
Pork MBM ^{c)}	A	NA	A
Pork and chicken MBM	A	NA	A

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

b) MELISA-TEK RUMINANT KIT for MEAT & BONE MEALS and ANIMAL FEED is a product of ELISA Technologies, Inc.

c) Pork meat and bone meal

Table 2 Comparison of characteristic of three ELISA kits

	Morinaga Ver.2	Morinaga	MELISA
Antibody	Mouse anti-bovine myoglobin monoclonal antibody	Rabbit anti-135 °C bovine serum albumin antibody	Troponin I monoclonal antibody
Positive control	High and low concentration positive controls	Dilute positive control by ×2, ×4, ×8, and ×16	Dilute 10 % positive control by 1 % and 0.05 %
Extraction solution	Mercaptoethanol additive-free	3.1 % mercaptoethanol additive	EDTA supplemented PBS
Extraction	50 mL tube	Homogenize with food processor	Erlenmeyer flask
	Shake with shaker		Shake with shaker
Reaction time	First reaction 1 hour	First reaction 2 hours	First reaction 20 minutes
	Second reaction 1 hour	Second reaction 30 minutes	Second reaction 20 minutes
	Enzyme reaction 20 minutes	Enzyme reaction 10 minutes	Third reaction 20 minutes Enzyme reaction 20 minutes
Determination (cutoff point)	Absorbance value of low concentration positive control	(Absorbance value of negative control) ×2	(Absorbance value of negative control) ×2

2 実験方法

2.1 試料

供試した飼料原料及び配合飼料は、飼料製造業者から入手した。とうもろこし、大麦等の粒状の飼料及び配合飼料は、検査試料約 150 g をミルサーで粒径 1 mm 程度になるまで粉砕した。その他の検査試料は調製せずに用いた。豚肉骨粉等は、反すう動物由来 DNA が含まれていないこと、それ以外の試料は、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。

2.2 試薬

1) 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 Ver.2」

i) 抽出液

キットに添付されている 10 倍濃縮抽出液 A 液 100 mL, 10 倍濃縮抽出液 B 液 100 mL 及び 10 倍濃縮抽出液 C 液 100 mL と精製水 700 mL とを混合して抽出液とした。

ii) 検体希釈液

キットに添付されている 10 倍濃縮検体希釈液 5 mL に蒸留水を加え 50 mL とした。

iii) 動物由来及び植物由来陰性対照液

キットに添付されている陰性対照溶液 I (特定動物種の筋肉組織対照液 (豚モモ肉 5 mg/mL 相当)) 及び陰性対照溶液 II (植物組織対照液 (植物配合飼料 5 mg/mL 相当)) を用いた。

iv) 高濃度及び低濃度陽性対照液

キットに添付されている高濃度標準品 (特定動物種の筋肉組織対照液 (牛モモ肉 50 µg/mL 相当)) 及び低濃度標準品 (特定動物種の筋肉組織対照液 (牛モモ肉 3 µg/mL 相当)) を用いた。

v) 抗体固相化モジュール

キットに添付されている抗体固相化プレートを用いた。

vi) 洗浄液

キットに添付されている 20 倍濃縮洗浄液 50 mL と蒸留水 950 mL とを混合して洗浄液とした。

vii) 酵素標識抗体溶液

キットに添付されている酵素標識抗体溶液を用いた。

viii) 酵素基質溶液

キットに添付されている酵素基質溶液 (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) 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」

3) ELISA Technologies 製「MELISA-TEK RUMINANT KIT for MEAT & BONE MEALS and ANIMAL FEED」

2.3 装置及び器具

1) 粉砕器：岩谷産業製 IFM-300DG

2) 振とう機：Scientific Industries 製 VORTEX-GENIE2

3) 遠心分離器：BECKMAN 製 Allegra 6 centrifuge

4) マイクロプレートリーダー：TECAN 製 Sunrise Rainbow Thermo

5) 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

6) シングルチャンネルマイクロピペット：BIOHIT 製 m1000 (100~1000 µL)

7) 8 チャンネルマイクロピペット：Eppendorf 製 Research M (30~300 µL)

2.4 試験方法

1) モリナガキット Ver.2

キットの説明書に記載された手順に従い試験を行った。内容は以下のとおりである。

i) 抽出

試料 1.0 g を量って 50 mL の遠心チューブに入れ、抽出液 19 mL を加え振とう機を用いて 30 秒間激しく攪はんした後 10 秒間静置した。この攪はん操作を繰り返し 3 回行った後、沸騰水浴中で 10 分間加熱した後放冷し、3,000×g で 10 分間遠心分離し、上清みをろ紙 (5 種 A) でろ過した。このろ液 50 µL をマイクロチューブ (容量 1.5 mL) に入れ検体希釈液 950 µL

を加えて振り混ぜ、ELISA 操作に供する試料溶液とした。

ii) ELISA 操作

試料溶液、高濃度及び低濃度陽性対照液、動物由来及び植物由来陰性対照液及び検体希釈液（ブランク用）各 100 μ 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、モジュール用ふたをして軽く振り混ぜた後、室温で 1 時間反応させた。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300 μ L を加えて 6 回繰り返し洗浄した。

次に、各ウェルに酵素標識抗体溶液 100 μ L ずつを加え、モジュール用ふたをして軽く振り混ぜた後、室温で 1 時間反応させた。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300 μ L を加えて 6 回繰り返し洗浄した。

次に、各ウェルに酵素基質溶液 100 μ L ずつを加え、モジュール用ふたをして軽く振り混ぜた後、遮光し室温で 20 分間反応させた。更に各ウェルに反応停止液 100 μ L ずつを加え、酵素反応を停止させた。30 分以内に各ウェルの 450 nm 及び 620 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 450 nm の吸光度値から 620 nm の吸光度値を差し引いた値を測定値とした。

iii) 試験の成立条件

以下の条件を全て満たした場合とした。

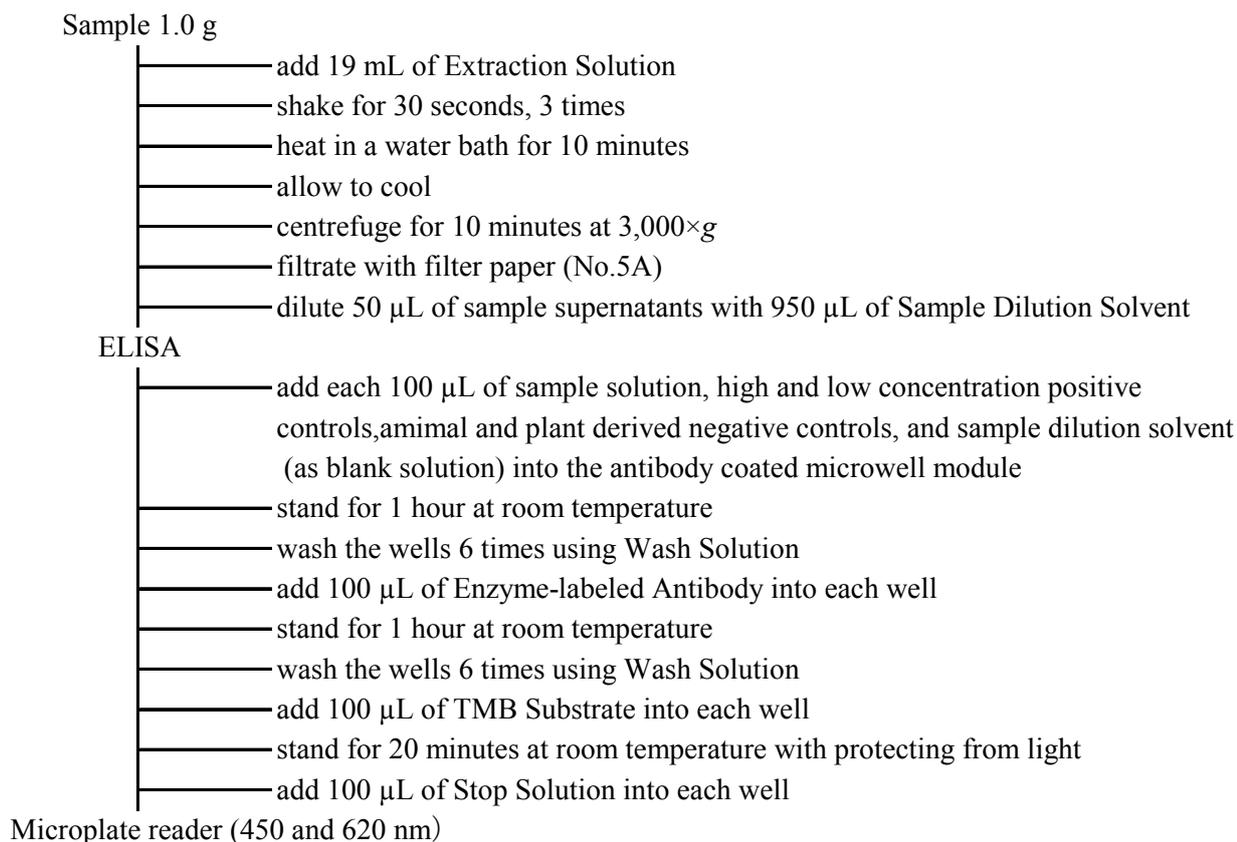
- ・測定されたブランクの測定値が 0.08 以下であり、かつ高濃度陽性対照液の測定値が 0.8 以上 1.6 以下であること。
- ・測定された動物由来及び植物由来陰性対照液の測定度が 0.08 以下であること。

iv) 判定

低濃度陽性対照液の測定値を陽性判定基準値とした。試料溶液の測定値が陽性判定基準値以上であった場合、当該試料は陽性と判定し、それ以外を陰性と判定した。

2) モリナガキット及びメライザキット

平成 22 年 6 月 4 日付けで一部改正された飼料分析基準に記載されている³⁾、ELISA による飼料中の動物由来たん白質の検出法に基づき実施した。



Scheme 1 Procedure of Morinaga Ver.2 assay

3 結果及び考察

3.1 特異性の検討

配合飼料 3 点, 植物性飼料原料 22 点及び動物性飼料原料 37 点を用いて, モリナガキット Ver.2 の反応性を検討するとともに, 現行の飼料分析基準に記載されている 2 つのキットとの比較を行った (Table 3) .

モリナガキット Ver.2 は, 供試した各飼料原料及び配合飼料すべてが陰性と判定され, 非特異反応は認められなかった. 一部の豚肉骨粉に対し測定値が高い値を示す傾向が見られたが, すべて陰性であった. 他の原料及び配合飼料はブランクの吸光度と同等の測定値を示し, 非特異反応は認められなかった.

メライザキットは, モリナガキット Ver.2 と同様に, 供試した各飼料原料及び配合飼料で非特異反応を示さなかった. しかしながら, メライザキットは豚肉骨粉中の牛肉骨粉に対しては特異性が高いものの⁴⁾, 配合飼料中の牛肉骨粉に対しては特異性が低く, 配合飼料の分析には適当ではないという報告⁵⁾がある. また, モリナガキットで非特異反応を示した一部の植物性飼料原料、牛由来の脱脂粉乳及び乾燥ホエーでは, モリナガキット Ver.2 は非特異反応を示さず, また, 豚及び牛由来のゼラチンについても非特異反応は見られなかった. これらのことから, モリナガキット Ver.2 は, 供試した植物性飼料, 動物性飼料及び配合飼料のうち, 牛肉粉及び牛肉骨粉のみ陽性反応を示し, 飼料中の牛由来たん白質検出に特異性の高いキットであることが示唆された.

Table 3 Specificity of various feed materials and bovine meat and bone meal (bovine MBM) using Morinaga Ver.2 assay

(+/- : Detected/Not detected)

Sample	Morinaga Ver.2	Morinaga	MELISA	Sample	Morinaga Ver.2	Morinaga	MELISA
Corn, flaked	-	-	-	Pork MBM 2	-	+	-
expanded	-	+	-	Pork MBM 3	-	+	-
Barley, flaked	-	-	-	Pork MBM 4	-		
Soybean meal, dehulled	-	-	-	Pork MBM 5	-		
Rapeseed meal	-	+	-	Pork and chicken MBM 1	-	+	-
Beet pulp	-	-	-	Pork and chicken MBM 2	-	+	-
Cotton seed	-	-	-	Pork and chicken MBM 3	-	+	-
Rice bran	-	-	-	Pork and chicken MBM 4	-	+	-
Corn gluten meal	-	-	-	Pork and chicken MBM 5	-	-	-
Corn gluten feed	-	-	-	Pork and chicken MBM 6	-	+	-
Grain sorghum	-	-	-	Pork and chicken MBM 7	-		
Wheat bran	-	-	-	Pork and chicken MBM 8	-		
Cacao husk	-	-	-	Pork and chicken MBM 9	-		
Palm kernel meal	-	-	-	Pork and chicken MBM 10	-		
Brewers grains	-	-	-	Pork and chicken MBM 11	-		
Soy sause cake	-	-	-	Pork and chicken MBM 12	-		
Paprika extract	-	-	-	Pork and chicken MBM 13	-		
toasted soybean flour	-	-	-	Chicken meal 1	-	-	-
Soybean flaked	-	-	-	Chicken meal 2	-	-	-
Rapeseed	-	-	-	Feather meal 1	-	-	-
Soybean curd residue	-	-	-	Feather meal 2	-	-	-
Dextrin	-	-	-	Dried skim milk 1	-	+	-
Formula feed 1	-	-	-	Dried skim milk 2	-		
Formula feed 2	-	-	-	Dried skim milk 3	-		
Formula feed 3	-	-	-	Dried Whey	-	+	-
Crab meal	-	-	-	Gelatin, porcine-derived 1	-		
Fish meal 1	-	-	-	Gelatin, porcine-derived 2	-		
Fish meal 2	-	-	-	Gelatin, bovine-derived 1	-		
Fish meal 3	-	-	-	Gelatin, bovine-derived 2	-		
Shell meal	-	-	-	Bovine MBM 1	+		+
Pork MBM1	-	+	-	Bovine MBM 2	+	+	

3.2 検出下限

肉用牛肥育用配合飼料，脱脂粉乳として20%相当量を添加した肉用牛肥育用配合飼料，魚粉，原料混合肉骨粉2種類及び豚肉骨粉を用い，それぞれに牛肉骨粉を0.05%及び0.1%添加した試料を調製して検出下限の検討を行った (Table 4)．各試料の吸光度を陽性対照溶液（低濃度標準品）の測定値 (=0.084) と比較すると，牛肉骨粉を添加した試料について，全ての濃度で牛由来たん白質が検出 (=陽性判定) 可能であった。

脱脂粉乳に牛肉骨粉を添加し添加試験を実施したところ、牛肉骨粉として 0.1 % 添加した時、牛由来たん白質を検出できなかった。そのため、実際の流通飼料の配合割合を考慮し、脱脂粉乳として 20 % 相当量を添加した肉用牛肥育用配合飼料を調製し、これを乳製品試料として牛肉骨粉を添加し添加試験を行った。その結果、牛肉骨粉を 0.05 % 添加した試料で牛由来たん白質を検出可能であった。しかしながら、飼料原料の製造方法及び配合飼料中の原料の混合条件等により測定値が異なること、また、試験室による試料の測定値のばらつきを考慮すると、当該キットの検出下限は 0.1 % と考えられた。現行のキットの検出下限は、メライザキットでは牛肉粉として 0.15 %⁴⁾、モリナガキットでは牛肉骨粉として 0.1 %⁶⁾であり、当該キットは現行のキットとほぼ同等の検出感度であることが示された。

Table 4 Results of Morinaga Ver.2 assay on six samples of feed containing bovine MBM at different levels

Sample	Contamination level of bovine MBM		
	0 %	0.05 %	0.10 %
	O.D. ^{a)}	O.D.	O.D.
Formula feed	0.016	0.143	0.243
Formula feed contained with 20 % dried skim milk	0.014	0.126	0.280
Fish meal	0.025	0.102	0.182
Pork and chicken MBM 1	0.036	0.115	0.207
Pork and chicken MBM 2	0.030	0.104	0.192
Pork MBM	0.051	0.109	0.187

a) Subtracted value of absorbance at 620 nm from absorbance at 450 nm

3.3 再現性に関する検討

検体希釈液を抗体固相化モジュールの 6 ウェル、高濃度陽性対照液を 4 ウェル、低濃度陽性対照液を 6 ウェル、豚肉骨粉の試料溶液を 64 ウェル、牛肉骨粉を 0.1 % 添加した豚肉骨粉の試料溶液を 16 ウェルに分注したプレートを 5 枚用いて同時再現性試験を行った (Table 5)。

高濃度陽性対照液、低濃度対照液及び牛肉骨粉を 0.1 % 添加した豚肉骨粉については全て陽性を示し、それぞれの全測定値に対する変動係数は 10 % 以下であり、また、豚肉骨粉は全て陰性を示し、その全測定値に対する変動係数は 15 % であった。このことから、当該キットのウェル間及びプレート間での測定値のばらつきは小さく、再現性の高さが示された。

Table 5 Within-run reproducibility of Morinaga Ver.2 using 60 strips of antibody coated microwell module

	Number of wells	O.D. ^{a)}	RSD ^{b)} (%)
Blank	30	0.011	37
Low concentration positive control	24	0.117	5.9
High concentration positive control	20	1.428	4.3
Pork MBM	320	0.034	15
Pork MBM containing 0.1 % bovine MB	80	0.195	3.6

a) Subtracted value of absorbance at 620 nm from absorbance at 450 nm

b) Relative Standard Deviation

3.4 安定性に関する検討

4 °C で 1 週間, 3 週間, 1 ヶ月間及び 2 ヶ月間保存したモリナガキット Ver.2 の, 陽性及び陰性対照液, 並びに添加試験で用いた牛肉骨粉無添加及び 0.1 % 添加した飼料に対する反応性について検討を行った (Table 6) .

保存期間に係わらず全てのキットで, 低濃度及び高濃度陽性対照溶液の測定値はそれぞれ $\pm 10\%$ 以内であり, 測定値は安定していた. また, 牛肉骨粉無添加の試料は全て陰性, 0.1 % 添加した試料は全て陽性を示し, それぞれの試料について各期間の測定値も大きなばらつきは見られなかった. これにより, 当該キットの 2 ヶ月間における高い安定性が示された. 今後, 期間を延長し, 保存による安定性の検討を行う予定である.

Table 6 Reactivity to positive and negative controls and six samples of feed using Morinaga Ver.2 stored for up to two months

(+/- : Detected/Not detected)

Sample	Contaminati on level of bovine MBM	Passed time										
		0		1 week		3 weeks		1 month		2 months		
		O.D. ^{a)}	O.D. Result									
Blank		0.015	0.021			0.017	0.021			0.024		
Low concentration positive control		0.104	0.116			0.107	0.106			0.107		
High concentration positive control		1.318	1.334			1.278	1.237			1.228		
Negative control (pork)		0.017	0.025			0.020	0.024			0.024		
Negative control (plant)		0.020	0.024			0.019	0.023			0.024		
Formula feed	0 %		0.020	-		0.016	-		0.021	-	0.021	-
	0.10 %		0.215	+		0.190	+		0.206	+	0.247	+
Formula feed contained with 20 % dried skim milk	0 %		0.022	-		0.019	-		0.020	-	0.020	-
	0.10 %		0.169	+		0.155	+		0.163	+	0.197	+
Fish meal	0 %		0.026	-		0.025	-		0.028	-	0.027	-
	0.10 %		0.203	+		0.192	+		0.203	+	0.239	+
Pork and chicken MBM 1	0 %		0.037	-		0.032	-		0.034	-	0.037	-
	0.10 %		0.215	+		0.194	+		0.207	+	0.238	+
Pork and chicken MBM 2	0 %		0.026	-		0.021	-		0.023	-	0.025	-
	0.10 %		0.193	+		0.181	+		0.191	+	0.220	+
Pork MBM	0 %		0.045	-		0.043	-		0.043	-	0.047	-
	0.10 %		0.200	+		0.182	+		0.184	+	0.221	+

a) Subtracted value of absorbance at 620 nm from absorbance at 450 nm

4 まとめ

モリナガキット Ver.2 による飼料中の牛由来たん白質の検出法について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 植物性飼料、動物性飼料及び配合飼料を用いて反応性を検討したところ、牛由来たん白質を特異的に検出することが確認された。
- 2) 肉用牛肥育用配合飼料、脱脂粉乳として 20 %相当量を添加した肉用牛肥育用配合飼料、魚粉、原料混合肉骨粉 2 点及び豚肉骨粉に牛肉骨粉を添加した試料を用いて、当該キットの検出下限を検討したところ、牛肉骨粉の検出下限は 0.1 %であり、現行のキットとほぼ同等の検出感度であった。
- 3) 抗体固相化モジュールを 5 プレート相当量用いて、高濃度及び低濃度陽性対照液、豚肉骨粉並びに牛肉骨粉を 0.1 %添加した豚肉骨粉の試料溶液について同時再現性試験を行ったところ、それぞれの測定値に大きなばらつきは見られず、高い再現性が示された。
- 4) 陽性及び陰性対照液、並びに添加試験で用いた牛肉骨粉無添加及び 0.1 %添加した飼料に対する、モリナガキット Ver.2 の各保存期間における反応性を確認したところ、2 ヶ月間におけるそれぞれの試料の測定値は一定しており、当該キットの安定性が示された。

謝 辞

本検討におきまして、ご協力いただきました株式会社森永生科学研究所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).
- 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規定に基づく動物由来たん白質及び動物性油脂の農林水産大臣の確認手続について」の一部改正について，平成 22 年 3 月 1 日，21 消安第 12077 号 (2010).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 4) 関口好浩，草間豊子：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，飼料研究報告，33，78-90 (2008).
- 5) M. J. Myers, *et al.*, Assessment of two enzyme-linked immunosorbent assay tests marketed for detection of ruminant proteins in finished feed, *J. Food Prot.*, 70(3), 692-699 (2007).
- 6) 日比野洋：「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット」を用いた飼料中の牛由来たん白質の検出法，飼料研究報告，29，181-188 (2004).

技術レポート**3 共通試料による飼料中の水銀の共同試験**

小森谷 敏一^{*1}, 甲斐 茂浩^{*2}, 齋藤 晴文^{*3},
岡田 かおり^{*4}, 高橋 雄一^{*5}, 佐古 理恵^{*6}

Interlaboratory Study of Mercury in Feeds

Toshiichi KOMORIYA^{*1}, Shigehiro KAI^{*2}, Harufumi SAITOU^{*3},
Kaori OKADA^{*4}, Yuuichi TAKAHASHI^{*5} and Rie SAKO^{*6}

(^{*1}Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department,
^{*2}Sapporo Regional Center, ^{*3}Sendai Regional Center,
^{*4}Nagoya Regional Center, ^{*5}Kobe Regional Center, ^{*6}Fukuoka Regional Center)

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¹⁾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²⁾に記載されている水銀の分析法については、標準添加回収試験は行われていたが、定量下限と検出下限の確認に関する検討は行われていなかった。そのため、今般、定量下限及び検出下限について当センターが内部精度管理の一環として実施した共同試験を基に改めて検討したのでその結果を報告する。

2 実験方法**2.1 試料**

市販の成鶏飼育用配合飼料を 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した後、十分混合して調製した。

2.2 装置及び器具

水銀分析装置：日本インスツルメンツ製 マーキュリーRA-3 (6 試験室)

2.3 定量方法

分析法は飼料分析基準第 4 章第 1 節 15 によった。

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

^{*4} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

^{*5} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

^{*6} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

2.4 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，同神戸センター及び同福岡センター

3 結果及び考察

3.1 定量下限及び検出下限

現在，飼料分析基準に記載されている水銀の分析法において，そ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に水銀として 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料について 7 回繰返し分析を行い，その定量値の標準偏差を求めた．また，併せて同様の方法により，計 6 試験室において，共同試験を実施した．

その結果は Table 1 のとおりであり，得られた各 6 試験室の標準偏差から，本法の定量下限及び検出下限を求めるために，各試験室の標準偏差の 10 倍及び 3.3 倍に相当する濃度を求めたところ，それらは最大で 0.03 mg/kg 及び 0.01 mg/kg であった．

よって，本法の定量下限及び検出下限はそれぞれ 0.03 mg/kg 及び 0.01 mg/kg であった．

Table 1 Collaborative study for mercury

Lab.No.	Quantitative value (mg/kg)			Mean value ^{a)} (mg/kg)	Standard deviation (mg/kg)	RSD _r ^{b)} (%)	RSD _R ^{c)} (%)	
1	0.0521	0.0478	0.0479	0.0480	0.0483	0.0024	4.2	8.8
	0.0455	0.0457	0.0508					
2	0.0550	0.0508	0.0569	0.0535	0.0541	0.0022		
	0.0515	0.0554	0.0553					
3	0.0575	0.0562	0.0567	0.0589	0.0576	0.0010		
	0.0588	0.0572	0.0577					
4	0.0572	0.0574	0.0585	0.0646	0.0605	0.0032		
	0.0589	0.0630	0.0638					
5	0.0507	0.0518	0.0536	0.0505	0.0519	0.0011		
	0.0515	0.0529	0.0521					
6	0.0591	0.0551	0.0573	0.0542	0.0552	0.0029		
	0.0526	0.0571	0.0509					

a) $n=7$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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**4 愛がん動物用飼料（ウェット製品）中のアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の液体クロマトグラフによる同時定量法の共同試験**野崎 友春^{*1}, 岩田 典子^{*2}Collaborative study of Determination of Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in Wet Type Pet Foods by LC-FLTomoharu NOZAKI^{*1} and Noriko IWATA^{*2}^{*1}Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center
(Now Fertilizer and Feed Inspection Department),^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center)**1 緒 言**

アフラトキシンは、かび毒の一種で、*Aspergillus flavus* 及び *Aspergillus parasiticus* によって産生される有害な二次代謝産物である。これらの菌は東南アジア、インド、ブラジル等の熱帯及び亜熱帯地域や米国に広く分布しており、落花生や各種農産物にアフラトキシン汚染を起こしている。輸入食品、飼料で検出例が多い作物は、とうもろこし、ハトムギ等である¹⁾。

アフラトキシンは遺伝毒性及び発がん性が認められている¹⁾ことから、各国で基準が定められており、我が国における食品中の規制²⁾は、総アフラトキシンが 10 µg/kg 以下とされている。飼料中の指導基準³⁾はアフラトキシン B₁ が幼齢期用配合飼料で 0.01 mg/kg 以下、その他の配合飼料で 0.02 mg/kg 以下とされている。今般設定された愛がん動物用飼料（以下「ペットフード」という。）中の成分規格⁴⁾は水分含有量 10% に換算したものに対して 0.02 mg/kg 以下とされた。なお、諸外国の飼料の基準は米国で総アフラトキシンとして 20 µg/kg 以下⁵⁾、EU ではアフラトキシン B₁ として 10 µg/kg 以下⁶⁾となっている。

現在、愛がん動物用飼料等の検査法⁷⁾に記載されている、アフラトキシンの分析法は適用範囲がドライ及びセミドライ製品であり、ウェット製品を適用範囲とする分析法は記載されていない。今回、平成 21 年度に（財）日本食品分析センターが検討したウェット製品を対象とするアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の液体クロマトグラフによる同時分析法⁸⁾が、愛がん動物用飼料等の検査法として適用可能と考えられたことから、妥当性確認の補足として共同試験を実施したので、その概要を報告する。

2 実験方法**2.1 試 料**

愛がん動物用飼料犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品をフードプロセッサで粉碎して供試試料として用いた。

^{*1} 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 同肥飼料安全検査部，^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

なお、それぞれに表示されていた原材料を Table 1 に示した。

Table 1 Ingredients list of the pet foods

Pet food types	Ingredients
Wet type for puppy and mother dog	Chicken , Corn , Barley , Soybean , Pork , Minerals(Na , P , Cl , Ca , P , Fe , Cu , Zn , I , Mn , Se) , Vitamins(B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D ₃ , E , Niacin , Pantothenic acid , Folic acid , Biotin , Choline) , Coloring agent(Iron oxide)
Wet type for adult cat	Pork liver , Pork , Chicken , Corn , Wheat , Corn starch , Cellulose , Animal fat , Chicken extract , Rice , Yeast , Vitamins , Amino acids(Taurine , Methionine) , Coloring agent(Caramel) , Thickening polysaccharide

2.2 試 薬

1) アフラトキシン B₁ 標準液

アフラトキシン B₁ (C₁₇H₁₂O₆) 標準品 (Acros organics 製, 純度 99.5 %) が正確に 10 mg 入ったバイアルにアセトニトリル 2 mL を正確に加えて溶かし, アフラトキシン B₁ 標準原液を調製した (この液 1 mL は, アフラトキシン B₁ として 5 mg を含有 ($f=0.995$)) .

2) アフラトキシン B₂ 標準液

アフラトキシン B₂ (C₁₇H₁₄O₆) 標準品 (Acros organics 製, 純度 98.5 %) が正確に 1 mg 入ったバイアルにアセトニトリル 2 mL を正確に加えて溶かし, アフラトキシン B₂ 標準原液を調製した (この液 1 mL は, アフラトキシン B₂ として 0.5 mg を含有 ($f=0.985$)) .

3) アフラトキシン G₁ 標準液

アフラトキシン G₁ (C₁₇H₁₂O₇) 標準品 (Acros organics 製, 純度 99.0 %) が正確に 1 mg 入ったバイアルにアセトニトリル 2 mL を正確に加えて溶かし, アフラトキシン G₁ 標準原液を調製した (この液 1 mL は, アフラトキシン G₁ として 0.5 mg を含有 ($f=0.990$)) .

4) アフラトキシン G₂ 標準液

アフラトキシン G₂ (C₁₇H₁₄O₇) 標準品 (Acros organics 製, 純度 98.7 %) が正確に 1 mg 入ったバイアルにアセトニトリル 2 mL を正確に加えて溶かし, アフラトキシン G₂ 標準原液を調製した (この液 1 mL は, アフラトキシン G₂ として 0.5 mg を含有 ($f=0.987$)) .

5) 混合標準液

使用に際して, 各アフラトキシン標準原液の一定量を正確にとり, アセトニトリルで正確に希釈し, 1 mL に各アフラトキシンとしてそれぞれ 50 ng を含有する各混合標準液を調製した.

6) リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)

リン酸緩衝生理食塩水錠剤 (和光純薬製 PBS Tablet) 2 個を 200 mL の全量フラスコに入れ, 水約 150 mL を加え, 超音波洗浄機を用いて溶解した. 更に標線まで水を加え混合し, リン酸緩衝生理食塩水を調整した.

7) トリフルオロ酢酸

シグマ アルドリッチ製 ReagentPlus, 99 %

- 8) アセトニトリルは液体クロマトグラフ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。

2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ装置：日本分光製 LC-2000 Series
- 2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W
- 3) ロータリーエバポレーター：BÜCHI 製 R-200
- 4) 遠心分離器：久保田商事製 5200
- 5) イムノアフィニティーカラム（IAC）：堀場製作所製 AFLAKING
- 6) 超遠心分離器：コクサン製 H-51
- 7) ガラス繊維濾紙：Whatman 製 934AH

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 50.0 g を量って 300 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (9+1) 70 mL を加え、15 分間振り混ぜて抽出した後 5 分間静置した。抽出液を 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を 200 mL の全量フラスコに入れた。共栓遠心沈殿管をアセトニトリル-水 (9+1) 35 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次先の褐色共栓三角フラスコに移し、同様に 15 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を先の共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに加え、更に標線までアセトニトリル-水 (9+1) を加えた。この液 5 mL を 25 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで PBS を加えた後、ガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液をカラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

イムノアフィニティーカラム内の保存液を液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた後、PBS 6 mL を加え、同様に流出させた。カラムにリザーバーを連結し、試料溶液 10 mL を正確に加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。PBS 10 mL を加え、同様に流出させた。更に水 10 mL を加え、同様に流出させた後、圧注して全量を流出させた。50 mL のなし形フラスコをカラムの下に置き、アセトニトリル 1 mL をカラムに加えて各アフラトキシンを溶出させた後、5 分間静置した。更にアセトニトリル 2 mL を加え、アフラトキシンを溶出させた後、圧注して全量を溶出させ、誘導体化反応に供する試料溶液とした。

3) 誘導体化

試料溶液を 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。残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加え、なし形フラスコを密栓し、振り混ぜた後 15 分間静置し、更に水-アセトニトリル (9+1) 0.9 mL を先のなし形フラスコに正確に加えて振り混ぜた。この液を 5,000×g (10,000 rpm) で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

同時に、混合標準液 10~400 µL の間の数点をそれぞれ 50 mL のなし形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した後、トリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加えた。以下、試料溶液と同様に操作し、1 mL 中にアフラトキシン B₁、B₂、G₁及び G₂としてそれぞれ 0.5~20 ng 相当量を含む各標準液を調製した。

4) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各混合標準液各 20 μ L を液体クロマトグラフに注入し、Table 2 の測定条件に従ってクロマトグラムを得た。

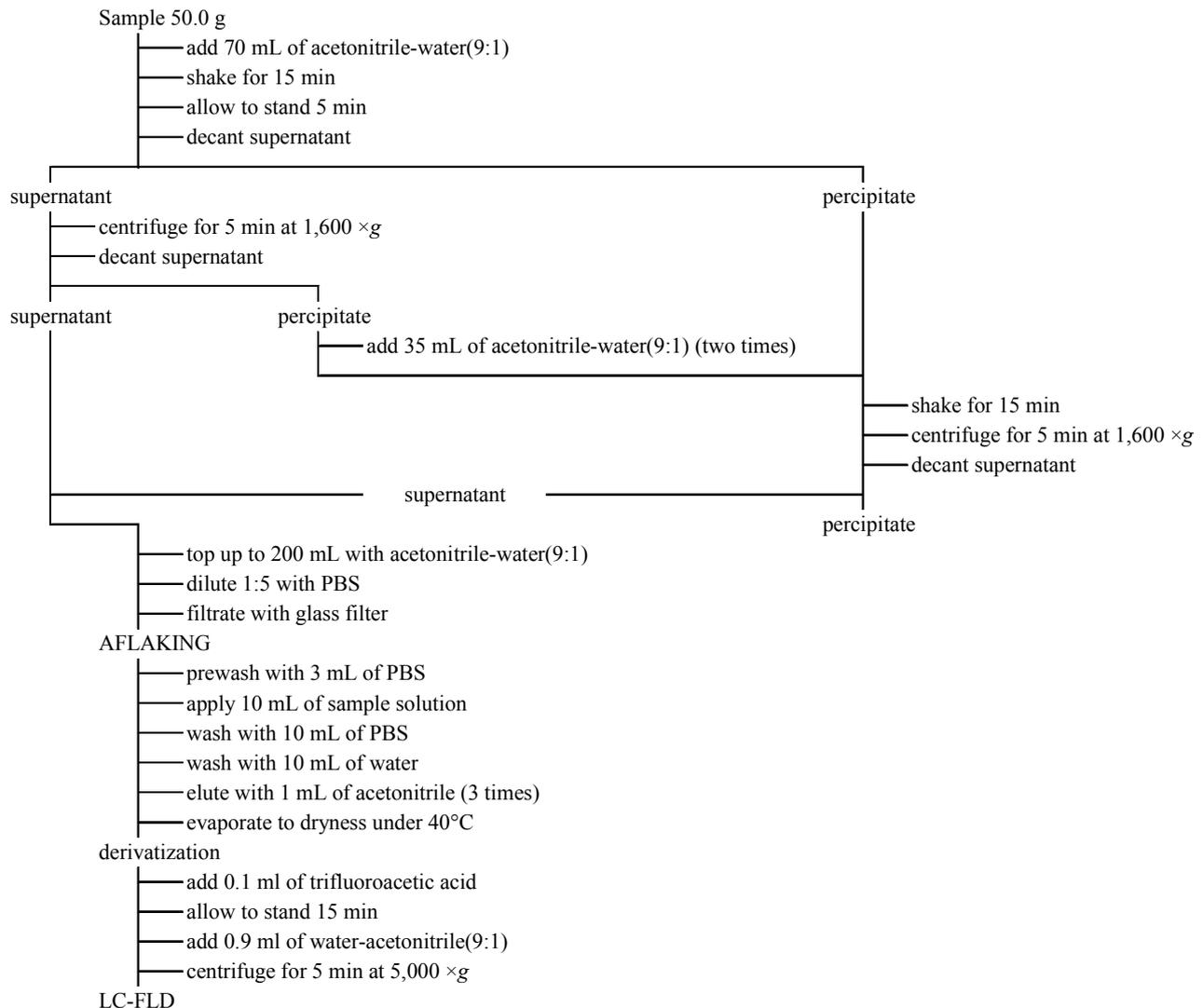
Table 2 Operating conditions of LC for analyzing aflatoxines

Column	Kanto Chemical mightysil RP-18(4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μ m)
Mobile phase	water-methanol (3:2)
Detector	Fluorescence detector (Ex: 365 nm, Em 450 nm)
Flow rate	0.8 mL/min
Column temperature	40 °C

5) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中の各アフラトキシン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for aflatoxines in wet type pet foods

3 結果及び考察

3.1 共同試験

本法の室間再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

市販の愛がん動物用飼料（ウェット製品）2 種類（犬用及び猫用）に各アフラトキシンとしてそれぞれ 2.0 µg/kg 相当量を添加した共通試料を用い、株式会社日清製粉グループ本社 QE センター、日本ハム株式会社中央研究所、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、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センターの 10 試験室で共同試験を実施した。

アフラトキシン B₁ での結果を Table 3 に示した。犬用ウェット製品では、平均回収率は 84.0 %、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（RSD_F 及び RSD_R）として 4.8 % 及び 13 % であり、HorRat は 0.60 であった。猫用ウェット製品では、平均回収率は 86.8 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_F 及び RSD_R として 1.7 % 及び 12 % であり、HorRat は 0.53 であった。

アフラトキシン B₂ での結果を Table 4 に示した。犬用ウェット製品では、平均回収率は 84.0 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_F 及び RSD_R として 1.9 % 及び 12 % であり、HorRat は 0.54 であった。猫用ウェット製品では、平均回収率は 84.7 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_F 及び RSD_R として 1.8 % 及び 12 % であり、HorRat は 0.57 であった。

アフラトキシン G₁ での結果を Table 5 に示した。犬用ウェット製品では、平均回収率は 84.3 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_F 及び RSD_R として 4.9 % 及び 10 % であり、HorRat は 0.47 であった。猫用ウェット製品では、平均回収率は 87.4 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_F 及び RSD_R として 2.6 % 及び 9.5 % であり、HorRat は 0.43 であった。

アフラトキシン G₂ での結果を Table 6 に示した。犬用ウェット製品では、平均回収率は 84.3 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_F 及び RSD_R として 2.3 % 及び 8.2 % であり、HorRat は 0.37 であった。猫用ウェット製品では、平均回収率は 85.2 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_F 及び RSD_R として 1.5 % 及び 8.8 % であり、HorRat は 0.40 であった。

なお、参考のため、各試験室で使用した液体クロマトグラフの機種等を Table 7 に示した。

Table 3 Collaborative study results of aflatoxin B₁

Lab. No.	Pet food types			
	Wet type for puppy and mother dog ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Wet type for adult cat ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	1.77	1.76	1.73	1.76
2	1.47	1.41	1.75	1.77
3	1.27	1.44	1.36	1.44
4	1.65	1.63	1.72	1.73
5	1.78	1.82	1.80	1.85
6	2.12	2.03	2.17	2.11
7	1.62	1.63	1.61	1.61
8	1.89	1.63	1.71	1.74
9	1.46	1.51	1.56	1.52
10	1.91	1.79	1.89	1.88
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2.00		2.00	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.68		1.74	
Recovery ^{a)} (%)	84.0		86.8	
RSD _r ^{b)} (%)	4.8		1.7	
RSD _R ^{c)} (%)	13		12	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22	
HorRat	0.60		0.53	

a) $n=20$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 4 Collaborative study results of aflatoxin B₂

Lab. No.	Pet food types			
	Wet type for puppy and mother dog		Wet type for adult cat	
	(µg/kg)		(µg/kg)	
1	1.61	1.60	1.56	1.62
2	1.55	1.54	1.75	1.69
3	1.44	1.42	1.32	1.38
4	1.60	1.62	1.69	1.70
5	1.76	1.78	1.80	1.83
6	2.11	2.06	2.14	2.09
7	1.58	1.59	1.55	1.52
8	1.75	1.70	1.70	1.72
9	1.54	1.51	1.52	1.57
10	1.97	1.86	1.87	1.85
Spiked level (µg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{a)} (µg/kg)	1.68		1.69	
Recovery ^{a)} (%)	84.0		84.7	
RSD _r ^{b)} (%)	1.9		1.8	
RSD _R ^{c)} (%)	12		12	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22	
HorRat	0.54		0.57	

a) $n=20$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 5 Collaborative study results of aflatoxin G₁

Lab. No.	Pet food types			
	Wet type for puppy and mother dog ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Wet type for adult cat ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	1.82	1.79	1.77	1.81
2	1.48	1.69	1.90	1.74
3	1.24	1.45	1.36	1.45
4	1.64	1.64	1.70	1.74
5	1.81	1.81	1.85	1.87
6	1.89	1.83	1.92	1.90
7	1.72	1.73	1.70	1.69
8	1.84	1.66	1.81	1.87
9	1.50	1.54	1.55	1.54
10	1.87	1.78	1.90	1.88
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2.00		2.00	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.69		1.75	
Recovery ^{a)} (%)	84.3		87.4	
RSD _r ^{b)} (%)	4.9		2.6	
RSD _R ^{c)} (%)	10		9.5	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22	
HorRat	0.47		0.43	

a) $n=20$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 6 Collaborative study results of aflatoxin G₂

Lab. No.	Pet food type			
	Wet type for puppy and mother dog		Wet type for adult cat	
	(µg/kg)		(µg/kg)	
1	1.69	1.69	1.68	1.70
2	1.58	1.66	1.76	1.76
3	1.50	1.46	1.38	1.45
4	1.66	1.66	1.74	1.74
5	1.79	1.82	1.86	1.87
6	1.83	1.79	1.85	1.81
7	1.72	1.72	1.67	1.66
8	1.64	1.55	1.67	1.59
9	1.52	1.57	1.55	1.55
10	1.98	1.88	1.91	1.89
Spiked level (µg/kg)	2.00		2.00	
Mean value ^{a)} (µg/kg)	1.69		1.70	
Recovery ^{a)} (%)	84.3		85.2	
RSD _r ^{b)} (%)	2.3		1.5	
RSD _R ^{c)} (%)	8.2		8.8	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22	
HorRat	0.37		0.40	

a) $n=20$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 7 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Agilent Technologies 1100 Series	Kanto Chemical Mightysil RP-18GP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)
2	Agilent Technologies 1100 Series	Kanto Chemical Mightysil RP-18GP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)
3	Shimadzu, Pump LC-10AD Detector RF-20A XS	GL Science Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)
4	Agilent Technologies 1100 Series	Showa Denko Shodex C18M4E (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)
5	Hitachi Lachrom Series	GL Science Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)
6	Waters, Pump 1517 Detector 2475	Kanto Chemical Mightysil RP-18GP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)
7	Hitachi L-2000 Series	Kanto Chemical Mightysil RP-18GP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)
8	Agilent Technologies 1100 Series	Kanto Chemical Mightysil RP-18GP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)
9	Agilent Technologies 1100 Series	Kanto Chemical Mightysil RP-18GP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)
10	Shimadzu, Pump LC-20AD Detector RF-20A XS	Kanto Chemical Mightysil RP-18GP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)

4 まとめ

愛がん動物用飼料（ウェット製品）中のアフラトキシンについて、分析センター法の愛がん動物用飼料等の検査法への適用の可否を検討するため、妥当性確認の補足として共同試験を実施したところ、次の結果を得た。

- 1) 愛がん動物用飼料（ウェット製品）2種類にアフラトキシンとしてそれぞれ 2.0 μg/kg 相当量を添加した共通試料を用いて 10 試験室で本法による共同試験を実施した。アフラトキシン B₁において、犬用ウェット製品では、平均回収率は 84.0%，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（RSD_f及び RSD_R）として 4.8%及び 13%であり、HorRat は 0.60 であった。猫用ウェット製品では、平均回収率は 86.8%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f及び RSD_Rとして 1.7%及び 12%であり、HorRat は 0.53 であった。アフラトキシン B₂において、犬用ウェット製品では、平均回収率は 84.0%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f及び RSD_Rとして 1.9%及び 12%であり、HorRat は 0.54 であった。猫用ウェット製品では、平均回収率は 84.7%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f及び RSD_Rとして 1.8%及び 12%であり、HorRat は 0.57 であった。アフラトキシン G₁において、犬用ウェット製品では、平均回収率は 84.3%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f及び RSD_Rとして 4.9%及び 10%であり、HorRat は 0.47 であった。猫用ウェット製品では、平均回収率は 87.4%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f及び RSD_Rとして 2.6%及

び 9.5 % であり、HorRat は 0.43 であった。アフラトキシン G₂ において、犬用ウェット製品では、平均回収率は 84.3 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 2.3 % 及び 8.2 % であり、HorRat は 0.37 であった。猫用ウェット製品では、平均回収率は 85.2 %、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 1.5 % 及び 8.8 % であり、HorRat は 0.40 であった。

謝 辞

共同試験にご協力いただいた株式会社日清製粉グループ本社 QE センター、日本ハム株式会社中央研究所、財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び財団法人マイコトキシン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：カビ毒評価書 総アフラトキシン（アフラトキシン B₁, B₂, G₁, G₂），平成 21 年 3 月 19 日府食第 261 号(2009).
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：アフラトキシンを含有する食品の取扱いについて，平成 23 年 3 月 31 日，食安発 0331 第 5 号 (2011).
- 3) 農林水産省畜産局長通達：飼料の有害物質の指導基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 農林水産省令・環境省令：愛がん動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，第 1 号 (2009).
- 5) FDA：CPG Sec. 555.400 Foods - Adulteration with Aflatoxin, Compliance Policy Guides , 1980/10/1, (1980).
- 6) THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION : on undesirable substances in animal feed, DIRECTIVE 2002/32/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL, 2002/5/7, (2002)
- 7) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛がん動物用飼料等の検査法」制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号，(2009)
- 8) 財団法人日本食品分析センター：平成 21 年度 愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業 ペットフード中の有害物質の分析法の開発，(2010).

技術レポート

5 愛がん動物用飼料（ウェット製品）中のデオキシニバレノールの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の共同試験

吉村 哲史^{*}，高橋 雄一^{*}，山多 利秋^{*}

Collaborative Study of Determination of Deoxynivalenol in Wet Type Pet Foods by LC-MS

Satoshi YOSHIMURA^{*}, Yuuichi TAKAHASHI^{*} and Toshiaki YAMATA^{*}

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

1 緒 言

デオキシニバレノール（以下「DON」という）は、主に*Fusarium*属のかび（赤かび）が産生するトリコテセン系のかび毒である。主な産生菌の*F. graminearum*, *F. culmorum*は、麦類を中心とした赤かび病の原因となる植物病原菌で、広く穀類に被害を与える¹⁾。

トリコテセン系かび毒による人や家畜に対する中毒症状としては、食欲減退、おう吐、胃腸炎、下痢等の消化器系への症状や、免疫機能の抑制等が知られている¹⁾。また、犬及び猫を用いたDON汚染飼料の給与試験において、高濃度（6 mg/kg~）では摂餌量の減少及びおう吐が見られたとの報告もある²⁾。

我が国においてDONが愛がん動物に対して危害を及ぼし問題となった事例はないが、飼料用のとうもろこし、麦類などの穀類から高濃度のDONが検出されることがあり、穀類及びその副産物を原料とする愛がん動物用飼料にも混入するおそれがある。このため、農林水産省では、愛がん動物用飼料中のDONについて、汚染実態のデータを収集した上で基準値を設定する方向で検討する物質と位置付けている³⁾。また、環境省は、犬及び猫用の愛がん動物用飼料中のDONに関してそれぞれ2及び1 µg/gの上限値を設けることについて、パブリックコメント等の手続きを実施している。なお、海外では、EUにおいて5 mg/kg、米国において2 mg/kgという指針がある。

愛がん動物用飼料中のDONの分析法としては、財団法人日本食品分析センターが開発した方法⁴⁾（以下「分析センター法」という。）が報告されており、当該方法は飼料分析基準⁵⁾第5章第3節4の「トリコテセン系かび毒の液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法」を基に検討されたものである。

本法は対象試料の水分含有量に応じて前処理の方法が2法に分かれており、ウェット製品を対象とする分析法については、分析センター法が愛がん動物用飼料等の検査法への適用可能と考えられたことから、妥当性確認の補足として共同試験を実施したので、その結果について概要を報告する。

* 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

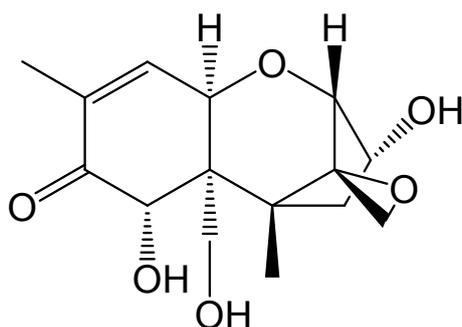
(3 α ,7 α)-3,7,15-trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-oneC₁₅H₂₀O₆ MW: 296.3 CAS No.: 51481-10-8

Fig. 1 Chemical structure of deoxynivalenol

2 実験方法

2.1 分析試料

愛がん動物用飼料成犬用ウェット製品及び成猫用ウェット製品をフードプロセッサーで破碎して供試試料として用いた。

なお、それぞれに表示されていた原材料を Table 1 に示した。

Table 1 Ingredients list of wet type pet foods

Pet food types	Ingredients
Wet type for adult dogs	Meat (Chicken, Beef, Mutton), Vegetables (Potato, Carrot, Greenpiece), Wheat flour, Polysaccharide, Minerals (K, Cl, Na, Mg, Zn, Se, I), Sodium tripolyphosphate, Flavor, Coloring agents (Titanium dioxide, Ferric oxide), Vitamins (Choline Chloride, Pantothenic acid, Biotin, E, B ₁ , D ₃ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , Folic acid), Antioxidant(EDTA-Ca-Na), Sodium nitrite
Wet type for adult cats	Pork, Fish, Wheat, Animal Fat, Corn Starch, Corn, Cellulose, Chicken extracts, Yeast, Minerals, Vitamins, Amino acids (Taurine, Methionine), Coloring agent (Ferric oxide), Polysaccharide

2.2 試薬

1) デオキシニバレノール標準液

DON [C₁₅H₂₀O₆]（純度 100.0 %, 和光純薬工業製）10 mg を正確に量って 50 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えた（この液 1 mL は、DON として 0.2 mg を含有する。）。更にこの液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に DON として 25 μ g を含有する DON 標準原液を調製した。使用に際して、標準原液の一定量を水-メタノール-アセトニトリル（18+1+1）で正確に希釈し、1 mL 中に DON として 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 及び 1 μ g を含有する各 DON 標準液を調製した。

2) アセトニトリル及びメタノールは液体クロマトグラフ用試薬を用いた。

2.3 器具

1) 多機能カラム：Romer Labs 製 MultiSep 227 Trich+

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 25.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (21+4) 70 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した後 10 分間静置した。抽出液を 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×g (3,000 rpm) で 5 分間遠心分離し、上澄み液を 200 mL の全量フラスコに入れた。共栓遠心沈殿管中の残さをアセトニトリル-水 (21+4) 70 mL で先の共栓三角フラスコに移し、同様に 30 分間振り混ぜて抽出 (2 回目) した。

2 回目の抽出液を先の共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに加えた。更に全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (21+4) を加え、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

試料溶液を多機能カラムに入れ、初めの流出液 3 mL を捨て、その後の流出液 5 mL を 10 mL の試験管に受けた。流出液 4 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

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

3) 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 DON 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、選択イオン検出クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 に示した。

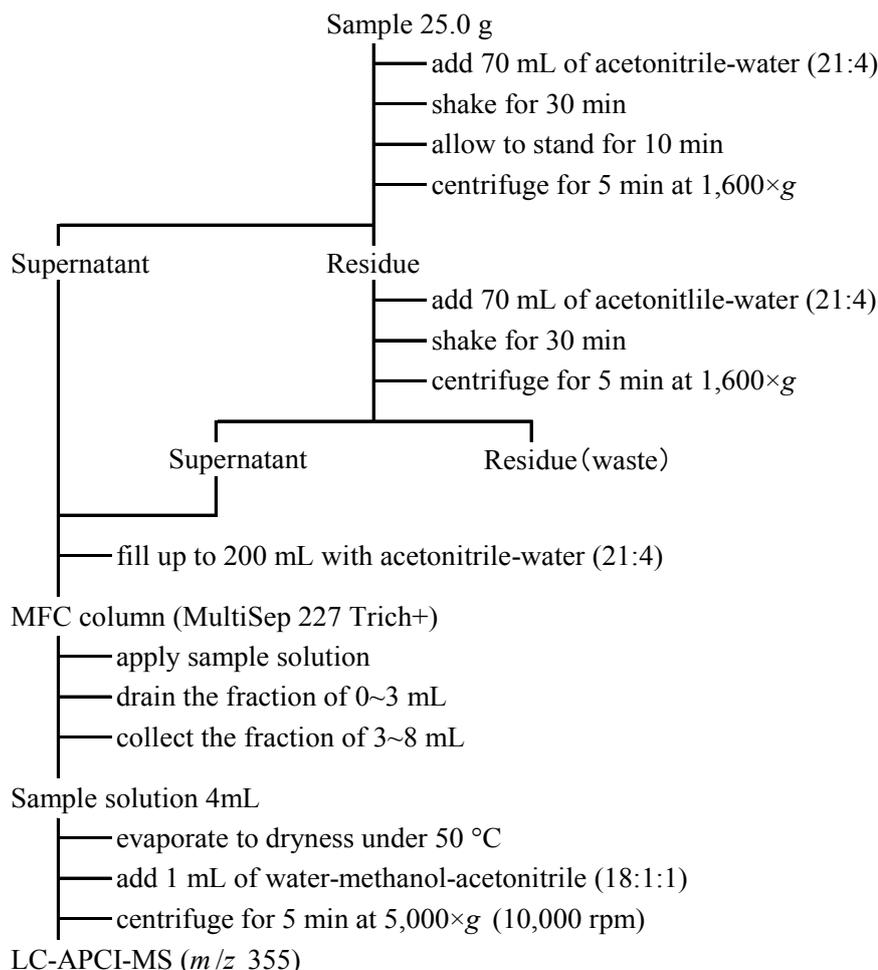
Table 2 Operating conditions of LC-MS for analysis of deoxynivalenol

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3 mm i.d.×250 mm, 5 µm)
Mobile phase	10 mmol/L Ammonium acetate solution - acetonitrile (19:1) (1 min) → 10 min → (1:1) → 4 min → (1:19) (15 min)
Flow rate	0.5 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Atmosphere pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Negative
Nebulizer	N ₂ (2.5 mL/min)
Interface temperature	400 °C
Heat block temperature	200 °C
CDL temperature	250 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 355 (for quantitation), 295 (for confirmation)

4) 計算

得られた選択イオン検出クロマトグラムから DON のピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の DON 量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for deoxynivalenol in wet type pet foods

3 結果及び考察

3.1 共同試験

ペットフード中の DON の分析法の再現精度を確認するため、犬用ウェット製品（水分 87 %以下）に DON として 0.04 mg/kg 相当量を添加した試料及び猫用ウェット製品（水分 77 %以下）に DON として 0.4 mg/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、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター、同福岡センターの計 6 試験室で共同試験を実施した。

結果を Table 3 に示した。犬用ウェット製品では、平均回収率 105 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_I 及び RSD_R として 11 %及び 12 %であり、HorRat は 0.53 であった。一方、猫用ウェット製品は自然汚染されていたため、ブランク値を求めて補正を行った。その結果、平均回収率は 103 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_I 及び RSD_R として 2.5 %及び 12 %であり、HorRat は 0.69 であった。

なお、参考のため、各試験室で使用した液体クロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 4 に示した。

Table 3 Collaborative study results of deoxynivalenol

Lab. No.	Wet type for dogs		Wet type for cats	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0330	0.0394	0.535	0.519
2	0.0415	0.0410	0.417	0.404
3	0.0527	0.0402	0.423	0.425
4	0.0460	0.0443	0.400	0.418
5	0.0391	0.0451	0.360	0.384
6	0.0395	0.0406	0.410	0.417
Spiked level (mg/kg)	0.0400		0.400	
Blank value (mg/kg)	ND (<0.010)		0.013	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0419		0.426	
Recovery ^{a)} (%)	105		103	
RSD _r ^{b)} (%)	11		2.5	
RSD _R ^{c)} (%)	12		12	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		18	
HorRat	0.53		0.69	

a) $n=12$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 4 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	LC-MS	LC column
		(i.d.×length, particle size)
1	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
2	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
3	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
4	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
5	Agilent Technologies 1100 Series	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
6	LC: Waters Alliance 2695 MS: Micromass Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)

4 まとめ

愛がん動物用飼料（ウェット製品）中の DON について、分析センター法の愛がん動物用飼料等の検査法への適用の可否を検討するため、妥当性確認の補足として共同試験を実施したところ、次の結果を得た。

- 1) 犬用ウェット製品に DON として 0.04 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、6 試験室で共同試験を実施した。その結果、平均回収率 105 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 11 % 及び 12 % であり、HorRat は 0.53 であった。
- 2) 猫用ウェット製品に DON として 0.4 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、6 試験室で共同試験を実施した。その結果、平均回収率は 103 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 2.5 % 及び 12 % であり、HorRat は 0.69 であった。

謝 辞

共同試験に参加いただいた財団法人日本食品分析センター多摩研究所の試験室の関係各位に感謝いたします。

文 献

- 1) 農林水産消費安全技術センター：<http://www.famic.go.jp/ffis/feed/info/profile/DON.pdf> (2011.5 現在)
- 2) D. M. Hughes, M. J. Gahl, C. H. Graham and S. L. Grieb: Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol, *J. Anim. Sci.*, **77**(3), 693-700 (1999).
- 3) 農業資材審議会飼料分科会及び同安全性部会並びに中央環境審議会動物愛護部会ペットフード小委員会合同会合（第3回）資料：愛がん動物用飼料の基準・規格 (2010).
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成 21 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業 ペットフード中の有害物質の分析法の開発, 47 (2009).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).

技術レポート**6 愛がん動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムの分光光度計による定量法の
共同試験**

甲斐 茂浩*

**Collaborative Study of Determination of Sodium Nitrite
in Pet Foods by Spectrophotometric Analysis**

Shigehiro KAI*

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

1 緒 言

亜硝酸ナトリウムはヘモグロビン等に作用して、加熱等により変色しにくい赤色を呈するといった発色効果があり、国内においては食品添加物（発色剤）に指定され¹⁾、広く食肉加工品等に使用されている。また、ボツリヌス菌等の微生物の発育阻止作用も認められている。

国内における食品中の規制値²⁾は、亜硝酸根としての最大残存量として食肉製品及び鯨肉ベーコンで 0.070 g/kg、魚肉ソーセージ及び魚肉ハムで 0.050 g/kg 並びにいくら、すじこ及びたらこで 0.0050 g/kg とされているが、飼料中における基準はない。また、愛がん動物用飼料（以下「ペットフード」という。）にも使用されているが、現在基準値は設定されていない³⁾。しかし、犬及び猫が亜硝酸ナトリウムを大量に含有するペットフードを食べることにより、チアノーゼなどを引き起こす可能性があることから、国内でもペットフード中の亜硝酸ナトリウムについて、基準値を設定することが検討されているところである。

現在、ペットフード中の定量法としては、財団法人日本食品分析センターが、平成 21 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業において開発した方法（以下「分析センター法」という。）があり⁴⁾、愛がん動物用飼料等の検査法に収載されている試験法の妥当性確認に従い⁵⁾、その精度と真度が確認されているところであるが、共同試験による室間再現精度は確認されていない。

今回、この分析センター法を用いて、共同試験を行い、愛がん動物用飼料等の検査法への適用の可否について検討したので、その概要を報告する。

2 実験方法**2.1 分析試料**

愛がん動物用飼料成猫用ドライ製品、全成長段階犬用セミドライ製品及び成犬用ウェット製品を、ドライ製品及びセミドライ製品についてはそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、ウェット製品はフードプロセッサで粉碎して供試試料として用いた。

それぞれに表示されていた原材料を Table 1 に示した。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

Table 1 Ingredients list of pet foods

Pet food types	Ingredients
Dry type for adult cats	Meat (Chicken, Turkey), Fat (Chicken), Fish (Salmon), Barley, Oats, Oatmeal, Cereals, Flaxseed, Vegetables (Potato, Carrot, Greenpiece, Spinach, Kelp, Chicory, Tomato, Parsley), Fruits (Apple, Blueberry, Cranberry), Minerals (Mn, Zn, Cu, Se), Yeast, Egg, Vitamins (Choline Chloride, Pantothenic acid, Biotin, A, E, B ₁ , D, B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , Folic acid, L-carnitine, Niacin), Extract (Rosemary, Yucca schidigera, GreenTea, Barley) Potassium chloride, Methionine, Taurine, Potassium iodate
Semi-dry type for dogs	Chicken, Tapioca, d-Sorbitol, Glycerin, Propylene glycol, Gelatin, Botanical protein, Baking powder, Sodium Chloride, Sodium Nitrite, Amino acid, Oligosaccharide, Vitamins (C, E), Sorbic acid
Wet type for adult dogs	Meat (Chicken, Beef, Mutton), Fish, Wheat flour, Minerals, Sodium Nitrite, Vitamins (Choline Chloride, Pantothenic acid, Biotin, Folic acid), Antioxidant(EDTA-Ca-Na), Coloring agents (Titanium dioxide)

2.2 試薬

- 1) 酢酸アンモニウム緩衝液 酢酸アンモニウム 80 g を水に溶かして 1 L とし、アンモニア水 (1+4) で pH を 9.0 に調整した。使用に際してこの液の一定量を水で 10 倍に希釈した。
- 2) 亜硝酸ナトリウム標準液 亜硝酸ナトリウム [NaNO₂] (105 °C で 4 時間乾燥したもの) 50 mg を正確に量って 500 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて亜硝酸ナトリウム標準原液を調製した (この液 1 mL は、亜硝酸ナトリウムとして 0.1 mg を含有する。)。使用に際して、標準原液の一定量を酢酸アンモニウム緩衝液で正確に希釈し、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 0.05~1 µg を含有する数点の亜硝酸ナトリウム標準液を調製した。
- 3) 硫酸亜鉛溶液 硫酸亜鉛七水和物 178 g を水に溶かして 1 L とした。
- 4) スルファニルアミド溶液 スルファニルアミド 1 g を塩酸 (10 w/v%) に溶かして 100 mL とした (使用時に調製し褐色瓶に貯蔵する。)
- 5) ナフチルエチレンジアミン溶液 N-(1-ナフチル) エチレンジアミン二塩酸塩 0.5 g を水に溶かして 100 mL とした (使用時に調製し褐色瓶に貯蔵する。)
- 6) 活性炭素 活性炭素を水で洗浄した後、風乾した。
- 7) その他、特記している試薬以外は特級を用いた。

2.3 定量方法

1) 試料溶液の調製

分析試料 5.0 g を正確に量って 200 mL の首太全量フラスコに入れ、酢酸アンモニウム緩衝液 150 mL を加え、密栓して振り混ぜた後、80 °C で 10 分間静置した。続いて硫酸亜鉛溶液 (10 w/v%) 20 mL を加え、密栓して振り混ぜた後、80 °C で 5 分間静置した。更に氷中で 5 分間静置した後、水酸化ナトリウム溶液 (30 w/v%) 2 mL を加え、10 分間静置した。首太全量フラスコの標線まで酢酸アンモニウム緩衝液を加え、ろ紙 (5 種 C) でろ過し、初めのろ液約 20 mL を捨て、その後のろ液を試料溶液とした。

ろ液が着色していた場合は、更に先のろ液に活性炭素約 0.5 g を加え、ろ紙 (5 種 C) でろ過し、初めのろ液約 20 mL を捨て、その後のろ液を試料溶液とした。

同時に、水 5 mL を用いて同一操作を行い、空試験溶液を調製した。

2) 定 量

試料溶液及び空試験溶液 10 mL を共栓試験管に正確に入れ、スルファニルアミド溶液 1 mL を正確に加え、密栓して混和した。続いてナフチルエチレンジアミン溶液 1 mL を正確に加え、密栓して混和した後、15 分間静置して試料溶液 (A) を得た。

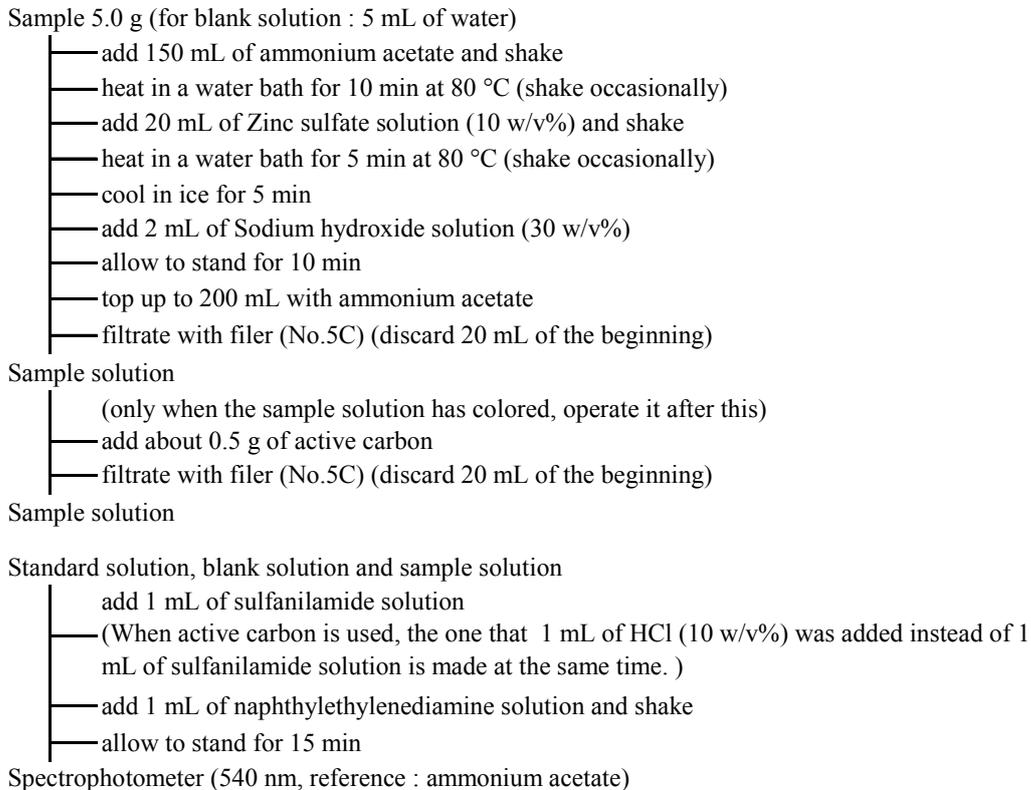
活性炭素による処理を行った場合は、別に試料溶液 10 mL を共栓試験管に正確に入れ、塩酸 (10 w/v%) 1 mL を正確に加えた後、密栓して混和し、更にナフチルエチレンジアミン溶液 1 mL を正確に加えて以下同様に操作を行い試料溶液 (B) を得た。

各亜硝酸ナトリウム標準液及び酢酸アンモニウム緩衝液について、同様の操作を行った。

酢酸アンモニウム緩衝液を対照液として試料溶液 (A) 及び空試験溶液について、波長 540 nm で吸光度を測定した。試料溶液 (A) の吸光度から空試験溶液の吸光度 (活性炭素処理を行った場合は空試験溶液の吸光度と試料溶液 (B) の吸光度を足した吸光度) を差し引いて吸光度を得た。

同時に酢酸アンモニウム緩衝液及び各亜硝酸ナトリウム標準液について、試料溶液 (A) の場合と同一条件で吸光度を測定した。得られた各亜硝酸ナトリウム標準液の吸光度から酢酸アンモニウム緩衝液の吸光度を差し引いて吸光度を得た。得られた吸光度から検量線を作成して、試料中の亜硝酸ナトリウム量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for Sodium Nitrite in pet foods

3 結果及び考察

3.1 共同試験

猫用ドライ製品，全成長段階犬用セミドライ製品及び成犬用ウェット製品に亜硝酸ナトリウムとして4，100及び20 mg/kg相当量をそれぞれ添加した試料を用い，財団法人日本食品分析センター多摩研究所，日本ハム株式会社中央研究所，株式会社日清製粉グループ本社QEセンター，独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，同札幌センター，同仙台センター，同名古屋センター，同神戸センター及び同福岡センターの計9試験室において本法に従って共同試験を実施した。

その結果はTable 2に示したように，猫用ドライ製品では平均回収率は95.0%，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（ RSD_r 及び RSD_R ）として2.4%及び4.6%であり，HorRatは0.36であった．犬用セミドライ製品では，平均回収率は102%，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1.6%及び2.0%であり，HorRatは0.26であった．成犬用ウェット製品では，平均回収率は97.2%，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1.1%及び1.9%であり，HorRatは0.19であった．

なお，参考のため，各試験室で使用した分光光度計の機種等をTable 3に示した．

Table 2 Collaborative study results of Sodium Nitrite

Lab.No.	Dry type for adult cats		Semi-dry type for dogs		Wet type for adult dogs	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	3.92	3.96	103	99.7	19.0	19.0
2	3.95	4.03	97.8	100	19.5	19.2
3	3.86	3.86	102	104	19.2	19.3
4	3.69	3.92	101	96.3	19.5	19.7
5	3.80	3.57	103	104	20.3	19.6
6	3.66	3.78	101	102	19.1	19.2
7	4.03	3.95	103	102	19.8	20.0
8	3.67	3.75	103	102	19.2 ^{e)}	21.0 ^{e)}
9	3.46	3.53	103	102	19.3	19.3
Spiked level (mg/kg)	4.00		100		20.0	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	3.80		102		19.4	
Recovery ^{a)} (%)	95.0		102		97.2	
RSD _r ^{b)} (%)	2.4		1.6		1.1	
RSD _R ^{c)} (%)	4.6		2.0		1.9	
PRSD _R ^{d)} (%)	13		8.0		10	
HorRat	0.36		0.26		0.19	

a) Dry type for adult cats and Semi-dry type for dogs : $n=18$, Wet type for adult dogs: $n=16$ (without Lab. No. 8)

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

e) Data excluded by Cochran test

Table 3 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	Instruments	
1	Shimadzu	UV-2450
2	Hitachi	U-2900
3	Hitachi	U-2001
4	Hitachi	U-3010
5	Shimadzu	UV-1800
6	JASCO	V-530
7	Shimadzu	UV-mini 1240
8	Shimadzu	BioSec-1600
9	Shimadzu	UV-mini 1240

4 まとめ

愛がん動物用飼料中の亜硝酸ナトリウムについて、分析センター法の愛がん動物用飼料等の検査法への適用の可否を検討するため、妥当性確認の補足として共同試験を実施したところ、次の結果

を得た。

- 1) 猫用ドライ製品、全成長段階犬用セミドライ製品及び成犬用ウェット製品に亜硝酸ナトリウムとして 4, 100 及び 20 mg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料を用い、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、猫用ドライ製品では平均回収率は 95.0 %、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 (RSD_f 及び RSD_R) として 2.4 % 及び 4.6 % であり、HorRat は 0.36 であった。犬用セミドライ製品では、平均回収率は 102 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 1.6 % 及び 2.0 % であり、HorRat は 0.26 であった。成犬用ウェット製品では、平均回収率は 97.2 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 1.1 % 及び 1.9 % であり、HorRat は 0.19 であった。

謝 辞

共同試験に参加いただいた財団法人日本食品分析センター多摩研究所、日本ハム株式会社中央研究所、株式会社日清製粉グループ本社 QE センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 厚生省令：食品衛生法施行規則，昭和 23 年 7 月 13 日，厚生省令第 23 号。
- 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。
- 3) 農林水産省令・環境省令：愛がん動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009)。
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成 21 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業 ペットフード中の有害物質の分析法の開発 (2009)。
- 5) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛がん動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号 (2009)。

精度管理

1 平成 22 年度飼料の共通試料による分析鑑定について

大島 慎司^{*1}, 松尾 信吾^{*2}, 佐藤 梢^{*3},
岡田 かおり^{*4}, 吉村 哲史^{*5}, 野村 晋平^{*6}

1 目 的

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

2 共通試料の内容

A 試料	中すう育成用配合飼料
B 試料	魚 粉
C 試料	鑑定用飼料原料調製試料
D 試料	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 22 年 7 月 2 日
3.2 調製場所 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

(1) A 試料

粉碎した後, 1 mm の網ふるいを通過させた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
	2	6	9	2	6	8	2
区画番号	9	4	4	9	8	7	7
	1	7	5	6	1	2	3
	5	1	3	8	3	4	5

*1 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

*2 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

*3 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

*4 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

*5 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

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

(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 11 種類の原料を同表の配合割合でよく混合した後、A 試料と同様の操作を行い、1 袋当たり約 180 g 入りの試料 450 個を調製した。

表 2 C 試料の原料及び配合割合

原 料 名	配合割合 (%)	原 料 名	配合割合 (%)
とうもろこし	30	アルファルファミール	8
小麦	10	米ぬか	7
マイロ	10	魚粉	3
精白米	10	りん酸カルシウム	2
大豆油かす	9	食塩	2
ごま油かす	9		

(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。

4 分析鑑定項目及び実施要領

(1) 分析鑑定項目

- A 試料・・・水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム、リン及びサリノマイシンナトリウム
- B 試料・・・水分、粗たん白質、粗灰分、カドミウム及びエトキシキン
- C 試料・・・11 種類の原料の配合割合の推定
- D 試料・・・銅、亜鉛及びクエン酸モランテル

(2) 実施要領「平成 22 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」(151 ページ)による。

5 試料袋間のバラツキ調査

A 試料、B 試料及び D 試料それぞれの 2 分析項目について、Thompson らの harmonized protocol¹⁾に基づき均質性確認テストを行った。ランダムに抜き取った 10 袋の併行分析の結果を表 3 に示した。また、その結果から一元配置の分散分析、均質性確認のための計算を行った結果を表 4 に示した。その結果、いずれも試料袋間のバラツキは分散比 F_0 が 3.02 より小さいことから、問題はなかった。

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	17.13	17.09	5.09	5.09	63.19	63.19	16.69	16.63	46.51	46.18	54.64	54.22
2	17.13	16.96	5.09	5.07	63.46	63.73	16.97	17.42	45.73	46.71	54.90	54.53
3	17.01	17.10	5.00	5.10	63.40	63.63	16.73	16.81	45.15	45.25	55.10	52.39
4	16.88	17.16	5.06	5.11	63.19	63.40	16.84	17.10	46.26	45.97	53.04	53.52
5	16.82	16.98	5.04	5.06	63.58	63.42	16.97	16.76	45.86	45.60	53.14	52.84
6	17.23	17.21	5.04	5.03	63.52	63.73	17.31	17.01	46.07	45.25	53.87	53.08
7	17.09	17.02	5.07	5.01	62.98	62.97	16.66	17.01	45.46	46.07	52.85	54.80
8	17.09	16.85	5.06	5.07	63.29	63.22	16.95	16.82	46.28	46.80	54.03	54.13
9	16.90	17.06	5.06	5.02	63.42	63.81	16.79	17.02	46.15	46.05	55.14	54.22
10	16.81	16.84	5.10	5.02	63.87	63.19	16.74	16.64	46.40	46.33	54.65	54.81

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 S	自由度 φ	不偏分散 V	分散比 F_0	S_s/σ^a
A試料	試料間 A	0.2143	9	0.0238	2.11	
	粗たん白質 分析誤差 E	0.1128	10	0.0113		— ^{b)}
	総計 T	0.3271	19			
粗灰分	A	0.0072	9	0.0008	0.59	
	E	0.0134	10	0.0013		—
	T	0.0206	19			
B試料	A	0.8589	9	0.0954	2.26	
	粗たん白質 E	0.4214	10	0.0421		—
	T	1.2804	19			
粗灰分	A	0.5617	9	0.0624	1.99	
	E	0.3129	10	0.0313		—
	T	0.8746	19			
D試料	銅 A	3.0091	9	0.3343	2.59	
	E	1.2908	10	0.1291		—
	T	4.2999	19			
亜鉛	A	7.1886	9	0.7987	1.20	
	E	6.6623	10	0.6662		—
	T	13.8509	19			

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

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

6 参加試験室

- (1) 総数 275
 うち 飼料関係…183
 飼料添加物関係…17
 団体等…31
 検査指導機関…44
- (2) 試料別参加試験室数
 A 試料…271
 B 試料…260
 C 試料…143
 D 試料…109

7 分析鑑定成績及び解析結果

(1) 分 析

各試料の分析成績は表 5 のとおりであり、ヒストグラムは図 1~16 のとおりである。その解析結果は表 6~8 のとおりである。なお、解析は次のとおり行った。

分析成績の解析は、次のとおりロバスト法により行った。式 1 により NIQR（標準四分位範囲－normalised inter quartile range－頑健な標準偏差）を求めた後、式 2 により、各分析成績の z -スコアを求めた。

$$\text{NIQR} = \frac{(c-a)}{1.349} \dots\dots\dots \text{式 1}$$

a : 上四分位の値

c : 下四分位の値

$$z\text{-スコア} = \frac{(x-b)}{\text{NIQR}} \dots\dots\dots \text{式 2}$$

x : 各試験室の分析成績

b : 中央値

また、異常値と考えられる z -スコアの絶対値が 3 以上の分析値を棄却した後、平均値の 95 %信頼区間を求めた。

(2) 鑑 定

今回は、11 種類の原料を混合調製した試料について、使用した原料の検出と配合割合の推定を実施した。その成績は表 9 及び 10 に示した。

表 5 分析成績 (1)

試料番号	水分			粗たん白質			粗脂肪			粗繊維			粗灰分			カルシウム			リン			SL (LC・P含有率)				
	分析値 (%)	No.	z-score	分析値 (g/力価/1)	No.	z-score																				
1	13.00	1	0.68				4.50	1	1.77	3.27	2	-0.12	4.97	1	-0.83											
2	12.65	1	-0.64	17.00	4	-0.53	3.84	2	-2.91				5.64	1	6.12	0.914	3	2.11	0.615	2	1.54					
21				17.55	3	1.74																				
3	12.78	1	-0.15	17.44	4	1.28	4.40	1	1.06				5.16	1	1.14											
4																										
5	12.90	1	0.30	17.36	2	0.95	4.41	1	1.13				5.23	1	1.86											
6	12.58	1	-0.91	16.97	3	-0.66							5.01	1	-0.41											
7	12.80	1	-0.07	16.88	1	-1.03							4.49	1	-5.81											
8	12.84	1	0.07	17.00	1	-0.53	4.66	1	2.91				4.81	1	-2.49											
10	12.68	1	-0.53	17.56	2	1.78							4.28	1	-7.99											
11	12.86	1	0.15	16.81	1	-1.32							4.92	2	-1.34											
12	12.76	1	-0.22	17.13	4	0.00	4.43	1	1.27				5.02	1	-0.31											
13	13.87	1	3.98	17.45	2	1.32	4.11	1	-0.99	3.18	2	-0.44	5.10	1	0.51	0.825	2	-0.49	0.601	1	0.43					
14	12.98	1	0.60	17.36	4	0.95	4.26	2	0.07	4.27	2	3.42	5.02	1	-0.31	0.820	3	-0.64	0.582	2	-1.07					
15	11.74	1	-4.10	16.67	2	-1.90	4.20	1	-0.35	2.80	2	-1.79	5.15	1	1.03	0.811	2	-0.90	0.595	1	-0.03					
16	12.96	1	0.53	17.36	4	0.95	4.18	2	-0.49				4.66	1	-4.04											
17	12.87	1	0.18	17.24	4	0.45	4.29	2	0.28	3.52	3	0.76	5.01	1	-0.41	0.830	2	-0.35	0.595	1	-0.03					
18	13.37	1	2.08	16.80	4	-1.36	4.19	1	-0.42	3.46	3	0.55	5.05	1	0.00	0.791	2	-1.49	0.594	1	-0.11					
20	13.02	1	0.75	17.18	2	0.20	4.06	2	-1.34	3.56	3	0.90	5.09	1	0.41	0.828	2	-0.41	0.599	1	0.27					
21	12.95	1	0.49	17.16	4	0.12	4.28	2	0.21	3.46	3	0.55	5.12	1	0.72	0.856	1	0.41	0.602	1	0.51					
22	13.27	1	1.71	17.14	4	0.04	3.96	2	-2.05	3.20	2	-0.37	5.13	1	0.83	0.810	3	-0.93	0.640	1	3.51					
23	12.96	1	0.53	17.15	4	0.08	4.11	2	-0.99	3.47	3	0.58	4.99	1	-0.62	0.930	1	2.58	0.604	1	0.67			49.5	3	0.85
24	12.67	1	-0.57	17.27	1	0.58	4.12	1	-0.92				5.12	1	0.72	0.800	1	-1.23	0.580	1	-1.22					
25	12.95	1	0.49	16.90	2	-0.95	4.15	1	-0.70	3.42	2	0.40	4.88	1	-1.76	0.870	2	0.82	0.602	1	0.51	53.2	1	1.66		
26	12.94	1	0.45	17.30	4	0.70	4.15	2	-0.70	3.68	3	1.33	4.96	1	-0.93	0.880	1	1.11	0.557	1	-3.05	49.9	2	0.48		
27	12.51	2	-1.17	16.83	4	-1.24	4.19	2	-0.42	3.22	2	-0.30	5.22	1	1.76				0.560	1	-2.81					
28	13.02	1	0.75	17.26	4	0.53	4.49	1	1.70	3.67	2	1.29	5.13	1	0.83	0.860	2	0.52	0.600	1	0.35					
29	13.16	1	1.29	17.08	4	-0.20	4.18	1	-0.49	3.76	2	1.61	5.05	1	0.00	0.830	2	-0.35	0.590	1	-0.43					
30	13.09	1	1.02	17.12	4	-0.04	4.14	1	-0.78	3.70	2	1.40	5.13	1	0.83	0.860	2	0.52	0.590	1	-0.43					
31	12.78	1	-0.15	17.30	4	0.70	4.29	1	0.28	3.37	2	0.23	5.15	1	1.03	0.830	2	-0.35	0.600	1	0.35					
32	12.73	1	-0.34	16.86	4	-1.12	4.44	1	1.34	3.61	2	1.08	4.86	1	-1.97	0.840	2	-0.05	0.590	1	-0.43			51.5	3	1.32
35	12.89	1	0.26	17.02	1	-0.45	4.45	1	1.42	3.54	2	0.83	5.00	1	-0.51	0.825	2	-0.49	0.602	1	0.51			49.6	3	0.87
36	12.86	1	0.15	17.26	4	0.53	4.16	2	-0.63	3.00	2	-1.08	5.06	1	0.10	0.870	1	0.82	0.630	1	2.73			42.1	3	-0.89
37	12.62	1	-0.76	17.01	4	-0.49	4.26	1	0.07	2.71	2	-2.11	5.07	1	0.20	0.820	2	-0.64	0.630	1	2.73			44.7	3	-0.28
38	12.55	1	-1.02	16.88	4	-0.62	4.41	1	1.13				4.91	1	-1.45											
39				16.88	2	-1.03																				
41	13.54	1	2.73	17.10	2	-0.12	4.05	2	-1.42	3.28	3	-0.08	5.06	1	0.10	0.891	2	1.43	0.593	1	-0.19			46.9	3	0.23
42	12.88	1	0.22	17.08	4	-0.20	4.13	2	-0.85	2.96	3	-1.22	4.95	1	-1.03	0.876	3	0.99	0.588	1	-0.59	52.5	1	1.41		
43	13.11	1	1.10	17.38	4	1.03	4.30	1	0.35				5.01	1	-0.41	0.817	2	-0.73	0.593	1	-0.19	48.4	1	-0.05		
44	10.65	1	-8.24	17.64	4	2.11	4.60	1	2.48				4.75	1	-3.11											
45	13.14	1	1.21	17.00	4	-0.53	4.23	1	-0.14	3.49	2	0.65	5.01	1	-0.41	0.844	2	0.05	0.581	1	-1.15					
46	12.54	1	-1.06	17.06	4	-0.29	4.15	1	-0.70				4.86	1	-1.97											
47	12.79	1	-0.11	17.13	1	0.00	4.11	1	-0.99				5.02	1	-0.31											
48	12.75	1	-0.26	17.09	4	-0.16	3.96	2	-2.05	3.45	2	0.51	5.05	1	0.00	0.862	2	0.58	0.598	1	0.19	46.0	1	-0.91		
51	12.60	1	-0.83	17.09	4	-0.16	4.27	1	0.14				5.06	1	0.10	0.803	2	-1.14	0.588	1	-0.59	45.2	1	-1.19		
52	12.71	1	-0.41	17.23	4	0.41	4.20	1	-0.35	3.42	2	0.40	4.95	1	-1.03	0.860	1	0.52	0.613	1	1.38					
53	12.80	1	-0.07	17.20	4	0.29	4.23	2	-0.14	3.39	2	0.30	4.94	1	-1.14	0.865	2	0.67	0.609	1	1.07					
54	12.70	1	-0.45	17.59	4	1.90	4.13	2	-0.85	3.26	3	-0.15	5.09	1	0.41	0.826	2	-0.46	0.594	1	-0.11					
55	12.29	1	-2.01	17.03	4	-0.41	4.55	1	2.13	3.37	2	0.23	4.95	1	-1.03	0.843	2	0.02	0.592	1	-0.27	47.0	1	-0.55		
56	12.99	1	0.64	17.00	4	-0.53	4.23	1	-0.14				5.11	1	0.62	0.780	2	-1.81	0.584	1	-0.91	49.5	1	0.33		
57	12.74	1	-0.30	17.26	4	0.53	4.22	2	-0.21				5.09	1	0.41							47.2	1	-0.48		
58	12.72	1	-0.37	17.40	4	1.12	4.32	1	0.49	3.38	1	0.26	4.87	1	-1.86	0.858	1	0.46	0.597	1	0.11					
59	12.29	1	-2.01	17.36	4	0.95																				
60	12.50	1	-1.21	17.40	2	1.12	4.20	1	-0.35				5.00	1	-0.51											
63	12.51	1	-1.17	17.60	4	1.95	4.38	1	0.92	3.38	2	0.26	5.07	1	0.20	0.822	2	-0.58	0.598	1	0.19					
64	12.49	1	-1.25	17.12	4	-0.04	4.33	2	0.56				5.10	1	0.51											
66	13.15	1	1.25	17.25	4	0.49	4.27	1	0.14				5.11	1	0.62											
68	13.17	1	1.33	17.50	1	1.53							4.80	1	-2.59											
69																										
70	12.84	1	0.07	19.10	4	8.17				3.63	3	1.15	5.13	1	0.83				0.630	1	2.73					
71	12.46	1	-1.36	17.70	4	2.36	4.43	1	1.27				5.16	1	1.14											
73	12.70	1	-0.45	17.01	4	-0.49	4.31	2	0.42	3.75	3	1.57	5.26	1	2.17	0.849	2	0.20	0.599	1	0.27			42.9	3	-0.71
74	9.04	1	-14.36										4.80	1	-2.59	0.836	2	-0.17	0.548	2	-3.76					
75	12.09	1	-2.77	17.11	1	-0.08	4.25	1	0.00	3.45	1	0.51	4.66	1	-4.04	0.678	3	-4.80	0.475	2	-9.56					
77				17.43	3	1.24	4.21	2	-0.28																	
78	12.76	2	-0.22	17.46	3	1.36							4.93	2</												

表 5 分析成績 (2)

試料 番号	水分			粗たん白質			粗脂肪			粗繊維			粗灰分			カルシウム			リン			SL(管理分析・フロンティア分析)		SL(LC・ペイパフェイ)			
	分析値 (%)	No.	z-score	分析値 (g(力価/力))	No.	z-score	分析値 (g(力価/力))	No.	z-score																		
105	13.09	1	1.02	16.83	3	-1.24	3.60	2	-4.61	3.38	3	0.26	5.07	1	0.20	0.880	2	1.11	0.604	1	0.67						
106	12.96	1	0.53	17.01	4	-0.49	4.36	1	0.78	3.40	2	0.33	5.05	1	0.00	0.821	2	-0.61	0.589	1	-0.51	46.8	1	-0.62			
107	13.18	1	1.36	17.11	4	-0.08	4.31	2	0.42				5.19	1	1.45	0.826	2	-0.46	0.563	1	-2.57	44.0	2	-1.62			
108				17.04	4	-0.37																					
109	12.75	1	-0.26	17.26	4	0.53	4.23	2	-0.14	3.49	3	0.65	4.96	1	-0.93	0.791	1	-1.49	0.592	1	-0.27						
110	12.70	1	-0.45	16.66	1	-1.95	4.22	1	-0.21	3.79	2	1.72	5.13	1	0.83												
111	12.89	1	0.26	17.38	4	1.03	4.20	1	-0.35	3.39	2	0.30	4.98	1	-0.72	0.860	1	0.52	0.598	1	0.19						
112	12.81	1	-0.03	17.10	4	-0.12	4.24	1	-0.07	3.27	1	-0.12	5.06	1	0.10	0.825	2	-0.49	0.584	1	-0.91						
112				17.11	3	-0.08																					
113	12.07	1	-2.85	17.09	4	-0.16	4.15	1	-0.70	3.35	2	0.15	5.02	1	-0.31	0.820	2	-0.64	0.577	1	-1.46	45.6	1	-1.05	43.2	3	-0.63
115	12.65	1	-0.64																								
116	13.24	1	1.59	16.91	2	-0.91	4.35	1	0.70	3.02	2	-1.01	5.05	1	0.00	0.819	2	-0.67	0.593	1	-0.19				45.9	4	0.00
117	12.53	1	-1.10																			52.0	1	1.23			
118																											
119	13.07	1	0.94	17.07	4	-0.24	4.20	2	-0.35	3.34	3	0.12	4.85	1	-2.07	0.827	2	-0.43	0.601	1	0.43						
120	12.23	1	-2.24	16.96	4	-0.70	4.18	1	-0.49	3.29	2	-0.05	5.06	1	0.10	0.835	2	-0.20	0.583	1	-0.99	47.5	1	-0.37			
121				17.43	3	1.24	4.21	2	-0.28	3.90	3	2.11															
122	13.13	1	1.17	16.93	3	-0.83	4.23	1	-0.14	3.40	1	0.33	5.03	1	-0.20	0.818	2	-0.70	0.585	1	-0.83	46.9	1	-0.58			
123	12.97	1	0.57	17.41	2	1.16	4.96	1	5.04	3.07	1	-0.83	5.05	1	0.00	1.010	2	4.92	0.592	1	-0.27						
124	12.74	1	-0.30	17.22	3	0.37	4.20	1	-0.35	3.53	4	0.79	5.07	1	0.20	0.820	2	-0.64	0.595	1	-0.03						
125				17.31	3	0.74																					
126	12.88	1	0.22	16.96	3	-0.70							5.15	1	1.03	0.979	2	4.01	0.597	1	0.11				42.8	3	-0.73
127	12.89	1	0.26	17.11	4	-0.08	4.45	1	1.42	3.30	3	-0.01	5.06	1	0.10	0.843	1	0.02	0.597	1	0.11	48.7	1	0.05			
128	12.27	1	-2.09	16.90	1	-0.95	3.35	1	-6.39	4.77	1	-2.90	4.77	1	-2.90	0.594	1	-0.11	0.594	1	-0.11						
130	12.87	1	0.18	16.96	4	-0.70	4.22	1	-0.21	3.47	3	0.58	5.09	1	0.41	0.838	2	-0.11	0.591	1	-0.35	45.8	2	-0.98	43.7	3	-0.52
130				17.41	3	1.16				3.51	3	0.72															
131	12.14	1	-2.58																			49.1	1	0.19			
133				16.50	1	-2.61	3.85	1	-2.84	3.52	2	0.76	4.99	1	-0.62	0.846	2	0.11	0.582	1	-1.07						
134	13.02	1	0.75	17.13	2	0.00	4.22	1	-0.21	3.23	2	-0.26	5.05	1	0.00	0.846	2	0.11	0.592	1	-0.27						
135	13.06	1	0.91	17.19	4	0.24	4.32	1	0.49	3.26	2	-0.15	4.99	1	-0.62	0.845	2	0.08	0.612	1	1.30				48.0	3	0.49
135																0.892	1	1.46									
136	12.82	1	0.00	17.14	4	0.04	4.32	1	0.49				4.92	1	-1.34	0.840	2	-0.05	0.588	1	-0.59						
137																0.836	2	-0.17	0.598	1	0.19						
138	12.13	1	-2.62	17.11	3	-0.08	4.35	1	0.70	3.59	4	1.01	4.96	1	-0.93	0.814	2	-0.82	0.599	1	0.27	49.3	1	0.26			
139	12.74	1	-0.30	16.94	4	-0.78	4.52	1	1.91	3.52	3	0.76	5.15	1	1.03	0.803	2	-1.14	0.605	1	0.75	49.1	1	0.19			
140	12.94	1	0.45	17.40	4	0.12	4.05	1	-1.42	3.54	1	0.83	4.82	1	-2.38	0.895	2	1.55	0.602	1	0.51						
141	12.95	1	0.49	17.27	3	0.58	4.44	1	1.34	3.26	2	-0.15	5.04	1	-0.10	0.851	1	0.26	0.596	1	0.03	48.3	1	-0.08			
142																						49.0	1	0.16			
144	13.01	1	0.72	16.40	1	-3.03	4.52	1	1.91				4.94	1	-1.14	0.842	2	0.00	0.608	1	0.99						
145	12.55	1	-1.02	17.66	4	2.19	4.18	2	-0.49	2.89	2	-1.47	5.07	1	0.20	0.832	2	-0.29	0.587	1	-0.67						
146	12.99	1	0.64	17.10	4	-0.12	4.45	2	1.42	3.94	3	2.25	5.13	1	0.83	0.861	2	0.55	0.574	1	-1.70						
147	12.66	1	-0.60	17.11	4	-0.08	4.16	1	-0.63	4.65	2	4.77	5.08	1	0.31	0.853	2	0.32	0.588	1	-0.59						
148	12.73	1	-0.34	16.81	3	-1.32	4.10	2	-1.06	3.26	2	-0.15	5.14	1	0.93	0.847	2	0.14	0.598	1	0.19				45.0	3	-0.21
149	12.83	1	0.03	17.32	4	0.78	4.19	1	-0.42	3.16	2	-0.51	5.02	1	-0.31	0.844	2	0.05	0.594	1	-0.11						
151	12.72	1	-0.37	16.93	4	-0.83	4.20	2	-0.35	4.28	3	3.46	5.20	1	1.55	0.849	2	0.20	0.593	1	-0.19						
152	13.06	1	0.91	17.08	1	-0.20	4.26	1	0.07	2.87	2	-1.54	5.06	1	0.10	0.862	1	0.58	0.598	1	0.19						
152				17.35	4	0.91				3.18	1	-0.44															
152				17.53	3	1.66																					
153	12.80	1	-0.07	17.10	4	-0.12	4.40	2	1.06	3.38	3	0.26	5.15	1	1.03	0.831	2	-0.32	0.585	1	-0.83						
153				17.79	3	2.73																					
154	13.17	1	1.33	17.14	2	0.04	4.29	1	0.28	3.17	2	-0.47	4.99	1	-0.62	0.849	2	0.20	0.595	1	-0.03						
155	13.04	1	0.83	17.13	3	0.00	4.23	1	-0.14	3.33	2	0.08	4.74	1	-3.21	0.803	2	-1.14	0.596	1	0.03						
155				17.43	1	1.24																					
156	12.91	1	0.34	17.12	1	-0.04	4.04	1	-1.49	2.93	2	-1.33	5.04	1	-0.10	0.809	2	-0.96	0.605	1	0.75						
159	12.66	1	-0.60	17.40	2	1.12							4.62	1	-4.46												
160	13.24	1	1.59	17.06	3	-0.29	4.18	1	-0.49	5.19	1	1.45	1.034	2	5.63	0.593	1	-0.19	0.593	1	-0.19	51.6	2	1.08			
161	12.77	1	-0.19	17.04	1	-0.37	4.23	1	-0.14	3.15	2	-0.55	4.98	1	-0.72	0.820	2	-0.64	0.600	1	0.35						
162	12.97	1	0.57	17.32	4	0.78	4.21	2	-0.28	3.30	3	-0.01	5.10	1	0.51	0.857	2	0.43	0.570	1	-2.02						
163	13.10	1	1.06	17.10	3	-0.12	4.17	2	-0.56	3.50	3	0.69	5.07	1	0.20	0.830	2	-0.35	0.628	1	2.57	45.9	1	-0.94			
181	12.68	1	-0.53	17.17	4	0.16	4.43	1	1.27	3.39	2	0.30	7.66	1	27.08	1.291	1	13.16	0.534	1	-4.88						
182	12.91	1	0.34	17.26	4	0.53				4.90	1	-1.55															
183	12.98	1	0.60	16.96	4	-0.70	4.10	2	-1.06	3.59	3	1.01	5.09	1	0.41	0.940	1	2.87	0.601	1							

表5 分析成績 (3)

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		粗(繊維分析・フローリソラス)		SL(LC・P・N付)				
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/力値/t)	No. z-score	分析値 (g/力値/t)	No. z-score															
200	12.69	1	-0.49	16.91	1	-0.91	4.33	1	0.56	3.07	1	-0.83	5.06	1	0.10						
201	12.15	1	-2.54	16.66	1	-1.95	4.34	1	0.63	2.71	2	-2.11	5.13	1	0.83	0.686	1	-4.57	0.483	1	-8.92
202	12.79	1	-0.11							4.96	2	-0.93	1.092	1	7.33	1.092	1	7.33	0.593	1	-0.19
203	12.22	1	-2.28							5.32	1	2.80									
207	12.33	1	-1.86	17.08	1	-0.20	4.62	1	2.62	3.01	2	-1.04	5.16	1	1.14	0.791	2	-1.49	0.598	1	0.19
208	13.31	1	1.86	17.06	4	-0.29	4.31	1	0.42	3.15	1	-0.55	5.04	1	-0.10	0.916	2	2.17	0.616	1	1.62
209	12.74	1	-0.30	16.92	4	-0.87	3.94	2	-2.20	3.31	2	0.01	5.05	1	0.00	0.857	2	0.43	0.581	1	-1.15
210	12.68	1	-0.53	17.49	4	1.49	4.43	1	1.27	2.78	2	-1.86	4.92	1	-1.34	0.838	2	-0.11	0.612	1	1.30
211	11.44	1	-5.24	16.97	2	-0.66	4.23	1	-0.14	3.55	2	0.86	5.00	1	-0.51	0.819	2	-0.67	0.647	1	4.08
212	13.00	1	0.68	17.45	2	1.32	4.09	1	-1.13	2.32	2	-3.49	5.23	1	1.86	0.822	2	-0.58	0.593	1	-0.19
213	12.79	1	-0.11	16.61	4	-2.15	4.26	1	0.07	2.92	2	-1.36	5.07	1	0.20	0.733	2	-3.19	0.635	1	3.13
231	12.81	1	-0.03	17.14	2	0.04	4.27	1	0.14	2.97	1	-1.18	5.08	1	0.31	0.872	2	0.87	0.586	1	-0.75
231																			49.3	3	0.80
241	13.22	1	1.52	16.14	3	-4.10	3.85	1	-2.84	3.25	2	-0.19	4.90	1	-1.55				49.5	4	0.85
242	12.66	1	-0.60	16.97	2	-0.66	4.34	1	0.63	4.34	1	0.63	5.09	1	0.41						
243	12.58	1	-0.91	17.31	4	0.74	4.29	1	0.28	2.86	2	-1.57	5.01	1	-0.41	0.845	2	0.08	0.596	1	0.03
244	12.33	1	-1.86	17.32	2	0.78	4.22	2	-0.21	3.47	2	0.58	4.65	1	-4.15						
245	12.78	1	-0.15	17.69	4	2.32	4.45	1	1.42	3.51	1	0.72	5.07	1	0.20						
246	12.76	1	-0.22	17.05	3	-0.33	4.44	1	1.34	3.42	2	0.40	5.06	1	0.10	0.830	2	-0.35	0.608	1	0.99
247	12.40	1	-1.59	16.96	4	-0.70	4.29	1	0.28	3.61	1	1.08	5.08	1	0.31	0.834	1	-0.23	0.605	1	0.75
248	12.56	1	-0.98	17.30	3	0.70	4.13	2	-0.85	2.45	1	-3.03	5.09	1	0.41	0.800	2	-1.23	0.434	1	-12.81
249	12.22	1	-2.28	17.16	4	0.12	4.10	1	-1.06	3.04	2	-0.94	5.10	1	0.51	0.862	2	0.58	0.619	1	1.86
250	12.74	1	-0.30	17.34	4	0.87	4.13	2	-0.85	3.48	2	0.62	5.06	1	0.10						
251	12.40	1	-1.59	16.93	4	-0.83	4.03	2	-1.56	2.78	2	-1.86	5.10	1	0.51						
252	13.23	1	1.55	17.26	3	0.53	4.35	1	0.70	2.85	2	-1.61	5.01	1	-0.41	0.878	1	1.05	0.604	1	0.67
253	13.06	1	0.91	17.14	4	0.04	4.13	2	-0.85	3.14	1	-0.58	5.09	1	0.41	0.901	2	1.73	0.601	1	0.43
254	12.78	1	-0.15	17.02	1	-0.45	4.31	1	0.42	3.27	2	-0.12	5.02	1	-0.31	0.869	2	0.79	0.599	1	0.27
255	12.72	1	-0.37	17.40	4	1.12	4.32	1	0.49	3.38	1	0.26	4.87	1	-1.86	0.858	1	0.46	0.597	1	0.11
256	13.03	1	0.79	17.23	2	0.41	4.24	1	-0.07	3.03	2	-0.97	5.08	1	0.31	0.841	1	0.00	0.601	1	0.43
257	12.78	1	-0.15	17.34	4	0.87	4.14	1	-0.78	3.13	2	-0.62	5.13	1	0.83	0.926	2	2.46	0.600	1	0.35
258	12.95	1	0.49							2.80	2	-1.79	5.11	1	0.62						
259	12.87	1	0.18	17.41	4	1.16	4.38	1	0.92	4.10	1	-0.65	4.98	1	-0.72						
260	12.28	1	-2.05	17.63	4	2.07	4.27	1	0.14	3.12	1	-0.65	5.09	1	0.41						
261	12.78	1	-0.15	16.96	4	-0.70	4.51	1	1.84	3.15	1	-0.55	5.09	1	0.41	0.893	2	1.49	0.570	1	-2.02
261				17.33	3	0.83															
262	12.72	1	-0.37	17.20	1	0.29	4.30	1	0.35				5.04	1	-0.10						
263	12.83	1	0.03	19.02	3	7.84	4.96	1	5.04	4.52	3	4.31	5.42	1	3.83						
264	13.02	1	0.75	17.21	4	0.33	4.27	1	0.14	3.30	2	-0.01	5.02	1	-0.31	0.830	2	-0.35	0.580	1	-1.22
265	12.29	1	-2.01	16.81	3	-1.32	4.12	2	-0.92												
266	12.81	1	-0.03	17.42	3	1.20	4.33	2	0.56				5.01	1	-0.41						
267	13.04	1	0.83	17.29	4	0.66	4.34	1	0.63	3.02	2	-1.01	5.06	1	0.10	0.849	2	0.20	0.578	1	-1.38
268																					
269	12.64	1	-0.68	17.34	2	0.87	4.47	1	1.56	3.03	2	-0.97	4.92	1	-1.34	0.839	1	-0.08	0.579	1	-1.30
270	12.73	1	-0.34	17.28	4	0.62	4.40	1	1.06	3.15	2	-0.55	5.06	1	0.10	0.846	2	0.11	0.575	1	-1.62
271	12.95	1	0.49				4.15	1	-0.70	3.18	2	-0.44	5.04	1	-0.10	0.843	2	0.02	0.591	1	-0.35
272	12.76	1	-0.22	17.15	3	0.08	4.21	1	-0.28	3.05	2	-0.90	5.03	1	-0.20	0.872	2	0.87	0.583	1	-0.99
273	13.03	1	0.79	17.16	2	0.12	4.14	1	-0.78	3.04	1	-0.94	5.03	1	-0.20	0.914	1	2.11	0.607	1	0.91
274	12.99	1	0.64	17.08	1	-0.20	4.25	1	0.00	3.44	1	0.47	5.04	1	-0.10	0.864	2	0.64	0.588	1	-0.59
275	13.11	1	1.10	17.16	4	0.12	4.52	1	1.91				5.10	1	0.51	0.856	2	0.41	0.598	1	0.19
276	12.90	1	0.30	17.28	1	0.62	4.30	1	0.35	3.15	2	-0.55	5.03	1	-0.20	0.840	1	-0.05	0.596	1	0.03
277	13.00	1	0.68	17.17	4	0.16	3.99	2	-1.84	3.42	3	0.40	5.10	1	0.51	0.957	1	3.37	0.599	1	0.27
278	12.35	1	-1.78	17.08	2	-0.20	4.31	1	0.42	3.88	2	2.04	4.72	1	-3.42	0.750	2	-2.69	0.550	1	-3.61
279	12.87	1	0.18	17.11	4	-0.08	4.17	1	-0.56	3.09	2	-0.76	4.93	1	-1.24	0.863	2	0.61	0.630	1	2.73
280	13.15	1	1.25	17.18	2	0.20	4.26	1	0.07	3.37	2	0.23	4.92	1	-1.34	0.835	2	-0.20	0.594	1	-0.11
281	12.84	1	0.07	17.34	3	0.87							5.06	1	0.10						
282	12.76	1	-0.22	17.47	2	1.41	4.51	1	1.84	4.97	1	-0.83	4.97	1	-0.83						
283	13.03	1	0.79	16.89	4	-0.99	4.28	1	0.21	3.18	1	-0.44	4.99	1	-0.62	0.819	2	-0.67	0.591	1	-0.35
284	12.58	1	-0.91	16.52	2	-2.53	4.18	1	-0.49	3.43	2	0.44	4.84	1	-2.17						
285	12.13	1	-2.62	16.62	4	-2.11	3.86	2	-2.76	3.77	3	1.65	4.94	1	-1.14	0.883	2	1.20	0.551	1	-3.53
286																					
287	12.56	1	-0.98										5.07	1	0.20						
306	12.74	1	-0.30	17.04	4	-0.37	4.03	2	-1.56	2.92	2	-1.36	5.02	1	-0.31	0.947	2	3.07	0.621	1	2.02
307	13.04	1	0.83	16.79	4	-1.41	4.50	1	1.77	2.58	2	-2.57	4.98	1	-0.72	1.243	2	11.75	0.589	1	-0.51
308	13.27	1	1.71	17.26	3	0.53	4.38	1	0.92	3.76	3	1.61	5.03	1	-0.20	0.853	2	0.32	0.583	1	-0.99
308				17.47	2	1.41															
309	12.93	1	0.41	17.68	2	2.28	4.79	1	3.83	3.14	2	-0.58	5.04	1	-0.10	0.865	1	0.67	0.591	1	-0.35
310	13.07	1	0.94	16.88	3	-1.03	4.36	1	0.78	3.11	1	-0.69	5.06	1	0.10	0.839	2	-0.08	0.604	1	0.67
311	13.12	1	1.13	17.18	4	0.20	4.20	3	-0.35				5.01	1	-0.41	0.867	2	0.73	0.587	1	-0.67
312	12.89	1	0.26	16.92	4	-0.87	4.42	1	1.20	3.23	3	-0.26	5.12	1	0.72	0.828	2	-0.41	0.601	1	0.43
313	12.38	1	-1.67	17.06	3	-0.29							5.38	1	3.42						
314	12.99	1	0.64	16.97	2	-0.66	3.81	1	-3.12	3.10	2	-0.72									

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・フォーリンゲッセ)	SL(LC・バ・バ(777))	
	分析値 (%)	No.	z-score			分析値 (g/力価/1)																		
324	12.39	1	-1.63	17.02	4	-0.45	4.57	1	2.27	3.67	1	1.29	5.08	1	0.31	0.867	2	0.73	0.593	1	-0.19			
325	12.83	1	0.03	16.92	4	-0.87	4.09	2	-1.13	3.45	2	0.51	5.01	1	-0.41	0.838	1	-0.11	0.588	1	-0.59			
326	12.99	1	0.64	17.33	4	0.83							5.11	1	0.62						48.0	1	-0.19	
327	12.49	1	-1.25	17.19	2	0.24	4.29	1	0.28				5.21	1	1.66									
328	12.66	1	-0.60	16.87	4	-1.07	4.55	1	2.13	3.13	1	-0.62	5.03	1	-0.20	0.869	2	0.79	0.599	1	0.27			
329	12.37	1	-1.71	15.90	1	-5.10	4.32	1	0.49	4.32	1	0.49	5.33	1	2.90				0.930	1	26.54			
330	13.07	1	0.94	17.07	2	-0.24	4.29	1	0.28	3.24	4	-0.23	5.06	1	0.10	0.970	1	3.75	0.600	1	0.35	51.1	1	0.91
331	12.79	1	-0.11	17.16	4	0.12	4.14	2	-0.78	4.47	1	1.56	5.13	1	0.83	0.905	2	1.84	0.593	1	-0.19	48.9	2	0.12
332	12.57	1	-0.94	18.19	2	4.32	4.47	1	1.56	3.77	2	1.65	5.02	1	-0.31				0.664	1	5.43			
333	12.93	1	0.41	16.88	4	-1.03	4.47	2	1.56	2.84	2	-1.65	5.15	1	1.03	1.161	2	9.35	0.613	1	1.38	50.9	1	0.83
334	12.61	1	-0.79	17.12	3	-0.04	4.15	1	-0.70	3.30	2	-0.01	5.15	1	1.03	1.040	2	5.80	0.650	1	4.32	42.7	1	-2.09
335	12.43	1	-1.48	17.14	4	0.04	4.22	1	-0.21	2.94	1	-1.29	5.07	1	0.20	0.831	2	-0.32	0.580	1	-1.22			
336	12.99	1	0.64	17.12	2	-0.04	4.19	1	-0.42				5.04	1	-0.10									
337	11.95	1	-3.30										4.62	1	-4.46	1.042	1	5.86	1.350	1	59.87			
338	12.91	1	0.34	12.20	2	-20.46	4.15	1	-0.70				5.01	1	-0.41									
339	13.27	1	1.71	17.08	4	-0.20	4.19	1	-0.42	3.58	3	0.97	5.13	1	0.83	0.900	2	1.70	0.610	1	1.15	47.1	3	0.28
340	12.78	1	-0.15	17.11	3	-0.08	4.40	1	1.06	1.61	2	-6.01	4.79	1	-2.69	0.800	2	-1.23	0.610	1	1.15	44.9	3	-0.23
341	13.00	1	0.68	17.07	2	-0.24	4.21	1	-0.28	3.36	2	0.19	4.91	1	-1.45	0.840	2	-0.05	0.590	1	-0.43			
342	12.33	1	-1.86	17.23	4	0.41	4.50	1	1.77	5.13	2	6.47	4.68	1	-3.83									
343	12.97	1	0.57	17.15	4	0.08	4.17	1	-0.56	3.24	2	-0.23	4.95	1	-1.03	0.820	2	-0.64	0.580	1	-1.22	46.0	1	-0.91
344	12.69	1	-0.49	17.53	2	1.66	4.78	1	3.76	4.22	2	3.24	5.03	1	-0.20	0.720	2	-3.57	0.617	1	1.70			
345	13.13	1	1.17	16.52	2	-2.53	4.29	1	0.28	3.80	3	1.75	5.07	1	0.20	0.733	2	-3.19	0.579	1	-1.30			
346	12.50	1	-1.21	16.49	2	-2.65	4.40	1	1.06	3.63	2	1.15	5.17	1	1.24	0.833	2	-0.26	0.652	1	4.48			
347	12.17	1	-2.47	17.54	4	1.70	4.58	2	2.34	3.57	1	0.94	5.11	1	0.62	0.830	2	-0.35	0.600	1	0.35			
348	12.99	2	0.64	17.17	3	0.16	4.15	2	-0.70	3.12	3	-0.65	5.16	1	1.14	0.854	2	0.35	0.584	1	-0.91	48.7	1	0.05
349	12.85	1	0.11	17.03	2	-0.41	4.62	1	2.62				5.11	1	0.62	0.850	2	0.23	0.610	1	1.15			
350	13.33	1	1.93	17.06	4	-0.29	4.44	1	1.34	3.31	1	0.01	5.57	1	3.39	0.850	1	0.23	0.570	1	-2.02	49.1	3	0.75
351	13.01	1	0.72	17.10	4	-0.12	4.14	1	-0.78				5.09	1	0.41									
352	12.65	1	-0.64	16.76	4	-1.53	4.26	1	0.07	5.09	1	0.41	5.09	1	0.41	0.835	2	-0.20	0.603	1	0.59			
353	13.15	1	1.25	17.97	3	3.48	4.12	2	-0.92	3.22	2	-0.30	4.96	1	-0.93	0.820	2	-0.64	0.591	1	-0.35			
354	12.82	1	0.00	17.19	4	0.24	3.98	2	-1.91	3.45	3	0.51	5.02	1	-0.31	0.822	2	-0.58	0.596	1	0.03			
355	12.54	1	-1.06	17.23	4	0.41	4.16	2	-0.63	3.34	2	0.12	5.07	1	0.20	0.914	2	2.11	0.511	1	-6.70	51.5	2	1.05
356	12.80	1	-0.07	17.40	1	1.12	4.08	1	-1.20	2.68	2	-2.21	5.07	1	0.20	0.823	2	-0.55	0.600	1	0.35	47.3	4	0.33
357	12.86	1	0.15	16.87	4	-1.07	4.36	1	0.78	2.80	1	-1.79	5.19	1	1.45	0.850	1	0.23						
402	12.93	1	0.41	17.00	3	-0.53	4.28	1	0.21	3.23	1	-0.26	5.09	1	0.41	0.833	2	-0.26	0.626	1	2.42			
403	12.51	1	-1.17	17.80	3	2.78	4.13	1	-0.85	3.19	2	-0.40	5.19	1	1.45									
404	12.89	1	0.26	17.22	3	0.37	4.20	1	-0.35	3.33	2	0.08	4.78	1	-2.80									
404				17.40	2	1.12				5.22	4	6.79												
405	12.97	1	0.57	17.06	4	-0.29	4.20	2	-0.35				5.08	1	0.31	0.819	1	-0.67	0.592	1	-0.27			
406	10.07	1	-10.45	17.50	3	1.53	4.28	1	0.21	3.66	3	1.26	4.92	1	-1.34	0.860	2	0.52	0.610	1	1.15			
408																0.840	1	-0.05	0.590	1	-0.43			
409				17.36	3	0.95							4.95	2	-1.03									
410	12.87	2	0.18	17.17	3	0.16																		
410				17.21	3	0.33																		
411	13.09	1	1.02	17.00	4	-0.53	4.26	2	0.07	3.58	3	0.97	4.80	1	-2.59	0.833	2	-0.26	0.597	1	0.11			
412				17.24	3	0.45																		
413	12.62	1	-0.76	16.98	3	-0.62	4.42	1	1.20	2.70	2	-2.14	4.88	1	-1.76	0.875	1	0.96	0.606	1	0.83	49.3	1	0.26
414																								
415	12.76	1	-0.22	17.24	2	0.45	4.27	1	0.14	3.24	2	-0.23	4.39	1	-6.84				0.587	1	-0.67			
416	13.16	1	1.29	16.44	2	-2.86	4.01	1	-1.70	4.30	2	3.53	5.31	1	2.69									
417	12.99	1	0.64	17.16	2	0.12	4.40	2	1.06	3.15	1	-0.55	4.86	1	-1.97	0.809	2	-0.96	0.591	1	-0.35			
426	13.11	1	1.10	16.77	2	-1.49	4.17	1	-0.56	2.45	2	-3.03	5.05	1	0.00									

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

水分	粗たん白質	粗脂肪	粗繊維	粗灰分	カルシウム	リン
No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法
1 飼料分析基準	1 硫酸標準液吸取法	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 ホウ酸溶液吸取法	2 自動分析機	2 ろ過法	2 その他	2 原子吸光度法	2 その他
3 その他	3 燃焼法	3 その他	3 自動分析機		3 その他	
	4 自動分析機		4 その他			

サリノマイシンナトリウム

- No. 分析方法
- 1 迅速定量法
 - 2 フローインジェクション法
 - 3 LC法
 - 4 バイオアッセイ

表 5 分析成績 (7)

試料 番号	B試料			粗たん白質			粗灰分			カドミウム		エトキシキン		銅		亜鉛		クエン酸モラシナル							
	分析値 (%)	No.	z-score	分析値 (%)	No.	z-score	分析値 (%)	No.	z-score	分析値 (g/トン)	No.	z-score	分析値 (g/kg)	No.	z-score	分析値 (g/kg)	No.	z-score	分析値 (g/kg)	No.	z-score				
200	9.13	1	0.05	63.35	1	-0.72	16.50	1	-0.07																
201																									
202	8.97	1	-0.86				16.38	2	-0.92																
203	8.78	1	-1.95				16.68	1	1.20																
207	8.65	1	-2.69	63.23	1	-0.91	16.66	1	1.06	0.74	2	-0.15	114.5	1	2.39	45.00	1	0.69	56.20	1	1.00	30.1	1	-0.25	
208	9.46	1	1.95	63.59	4	-0.35	16.47	1	-0.28																
209	9.04	1	-0.45	63.82	4	0.00	16.35	1	-1.13																
210	9.00	1	-0.68	63.79	4	-0.04	16.36	1	-1.06																
211	8.44	1	-3.90	64.33	2	0.79	16.59	1	0.56																
212	9.07	1	-0.28	69.49	2	8.79	16.52	1	0.07																
213	9.06	1	-0.34	62.99	4	-1.28	16.49	1	-0.14							39.89	1	-4.03	50.24	1	-1.84				
231	9.10	1	-0.11	64.52	2	1.08	16.64	1	0.92	0.69	2	-0.92	101.9	1	0.38	43.65	1	-0.55	53.61	1	-0.23	29.5	1	-0.63	
231																									
241	9.17	1	0.28	59.67	3	-6.43	16.46	1	-0.35																
242	8.82	1	-1.72	63.91	2	0.13	16.22	1	-2.05	0.78	2	0.46													
243	8.94	1	-1.03	63.44	4	-0.58	19.63	1	2.15																
244	8.77	1	-2.00	64.40	2	0.89	16.45	1	-0.42																
245	9.03	1	-0.51	64.75	4	1.44	16.50	1	-0.07																
246	9.06	1	-0.34	64.88	3	1.64	16.38	1	-0.92																
247	8.80	1	-1.83	62.83	4	-1.53	16.49	1	-0.14														31.4	1	0.57
248	8.93	1	-1.09	63.85	3	0.04	16.46	1	-0.35				94.6	1	-0.78								27.4	1	-1.96
249	8.76	1	-2.06	63.55	4	-0.41	16.79	1	1.98							43.95	1	-0.27	55.20	1	0.52		30.9	1	0.25
250	9.00	1	-0.68	63.63	4	-0.29	16.54	1	0.21																
251	8.77	1	-2.00	62.26	4	-2.41	16.57	1	0.42																
252	9.30	1	1.03	64.38	3	0.86	16.50	1	-0.07																
253	9.18	1	0.34	63.99	4	0.26	16.68	1	1.20	0.70	2	-0.77	94.6	1	-0.78	46.10	1	1.71	59.22	1	2.44				
254	8.72	1	-2.29	63.66	1	-0.24	16.61	1	0.70																
255	9.19	1	0.40	63.06	4	-1.17	16.42	1	-0.63																
256	9.05	1	-0.40	63.76	2	-0.09	16.67	1	1.13	0.71	2	-0.61				43.79	1	-0.42	55.92	1	0.87	33.0	1	1.58	
257	8.97	1	-0.86	64.36	4	0.83	16.49	1	-0.14	1.23	2	7.40				42.61	1	-1.51	51.67	1	-1.16				
258	9.29	1	0.97				16.40	1	-0.78																
259	9.08	1	-0.22	64.49	4	1.03	16.55	1	0.28				99.2	1	-0.04	44.98	1	0.68	54.56	1	0.22		32.9	1	1.52
260	9.03	1	-0.51	63.66	4	-0.24	16.52	1	0.07																
261	9.07	1	-0.28	62.92	4	-1.39	16.51	1	0.00																
261				64.11	3	0.44																			
262	8.87	1	-1.43	64.60	1	1.20	16.45	1	-0.42																
263	9.14	1	0.11	69.11	3	8.20	17.74	1	8.73																
264	9.20	1	0.45	67.69	4	6.00	16.51	1	0.00																
265	8.45	1	-3.84	63.13	3	-1.06																			
266	9.17	1	0.28	64.03	3	0.32	16.39	1	-0.85																
267	9.16	1	0.22	64.64	4	1.27	16.55	1	0.28							44.51	1	0.24	50.64	1	-1.65				
268																46.17	1	1.78	54.24	1	0.06		34.5	1	2.53
269																									
270	9.05	1	-0.40	64.58	4	1.17	16.60	1	0.63	0.75	2	0.00	99.0	1	-0.07	44.90	1	0.60	57.18	1	1.47				
271	9.14	1	0.11				16.70	1	1.34	0.77	1	0.30	98.1	1	-0.22	44.77	1	0.48	56.54	1	1.16		29.3	1	-0.76
272	9.12	1	0.00	64.10	3	0.43	16.91	1	2.84							37.36	1	-6.32	48.25	1	-2.79		29.8	1	-0.44
273																									
274	9.21	1	0.51	64.19	1	0.57	16.49	1	-0.14	0.88	1	2.00				44.47	1	0.20	54.38	1	0.13				
275	9.20	1	0.45	63.41	4	-0.63	16.69	1	1.27	0.96	1	3.23													
276	9.11	1	-0.05	63.90	1	0.12	16.50	1	-0.07																
277	9.13	1	0.05	63.86	4	0.06	16.43	1	-0.56				105.0	1	0.87										
278	8.76	1	-2.06	63.00	2	-1.27	16.40	1	-0.78																
279	9.06	1	-0.34	63.88	4	0.09	16.16	1	-2.48	0.78	1	0.46				35.41	1	-8.12	47.81	1	-3.00				
280	9.26	1	0.80	64.23	2	0.63	16.51	1	0.00							44.17	1	-0.06	54.55	1	0.21				
281	9.19	1	0.40	64.32	3	0.77	16.52	1	0.07																
282	8.96	1	-0.91	63.55	2	-0.41	16.34	1	-1.20	0.67	2	-1.23													
283	9.25	1	0.74	62.42	4	-2.17	16.45	1	-0.42	0.70	2	-0.77	95.7	1	-0.60	43.41	1	-0.77	55.40	1	0.62				
284	8.85	1	-1.54	67.38	2	5.52	16.31	1	-1.42																
285	8.45	1	-3.84	61.30	4	-3.90	16.24	1	-1.91																
286													110.8	1	1.80	44.37	1	0.11	55.03	1	0.44		31.9	1	0.88
287													103.4	1	0.62										
306	9.27	1	0.86	64.07	4	0.38	16.51	1	0.00							45.19	1	0.87	59.11	1	2.39		29.8	1	-0.44
307	9.28	1	0.91	62.99	4	-1.28	16.68	1	1.20																
308	9.41	1	1.66	63.77	3	-0.07	16.65	1	0.99	0.88	1	2.00	136.1	1	5.84	45.99	1	1.61	57.96	1	1.84				
308				63.82	2	0.00																			
309	9.24	1	0.68	64.07	2																				

表 5 分析成績 (8)

試料 番号	B試料						D試料																	
	水分		粗たん白質		粗灰分		カドミウム		エトキシキン		銅		亜鉛		クエン酸モランテル									
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/トン)	No. z-score	分析値 (g/トン)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score								
324	8.75	1	-2.12	63.42	4	-0.62	16.65	1	0.99															
325	9.10	1	-0.11	63.23	4	-0.91	16.53	1	0.14															
326	9.28	1	0.91	64.27	4	0.69	16.54	1	0.21	88.0	1	-1.83												
327	8.61	1	-2.92	62.95	2	-1.34	16.45	1	-0.42															
328	9.10	1	-0.11	63.10	4	-1.11	16.63	1	0.85				45.16	1	0.84	62.88	1	4.20						
329	8.83	1	-1.66	62.87	1	-1.47	16.60	1	0.63	0.68	2	-1.07												
330	9.86	1	4.24	63.69	2	-0.20	16.52	1	0.07									14.5	1	-10.15				
331	8.99	1	-0.74	64.80	4	1.51	16.45	1	-0.42															
332	8.99	1	-0.74	64.61	2	1.22	16.56	1	0.35															
333	9.17	1	0.28	63.40	4	-0.65	16.64	1	0.92															
334	8.95	1	-0.97	64.48	3	1.02	16.63	1	0.85															
335	8.87	1	-1.43	63.93	4	0.17	16.56	1	0.35															
336	9.26	1	0.80	63.26	2	-0.86	16.40	1	-0.78															
337	8.69	1	-2.46				16.55	1	0.28	0.62	2	-2.00	101.5	1	0.31	42.74	1	-1.39	49.74	1	-2.08			
338	9.17	1	0.28	64.35	2	0.82	16.13	1	-2.69															
339	9.49	1	2.12	63.91	4	0.13	16.57	1	0.42															
340	9.08	1	-0.22	64.71	3	1.38	16.32	1	-1.34	0.91	2	2.46	110.0	1	1.67					27.4	1	-1.96		
341	9.20	1	0.45	64.27	2	0.69	16.36	1	-1.06				44.92	1	0.62	54.99	1	0.42						
342	9.04	1	-0.45	62.85	4	-1.50	16.29	1	-1.56															
343	9.17	1	0.28	64.75	4	1.44	16.57	1	0.42				43.57	1	-0.62	51.70	1	-1.14						
344	9.23	1	0.63	62.92	2	-1.39	16.57	1	0.42															
345	9.19	1	0.40	61.40	2	-3.75	16.51	1	0.00															
346	8.81	1	-1.77	62.13	2	-2.62	16.85	1	2.41	0.82	1	1.07	99.4	1	-0.01	46.16	1	1.77	56.50	1	1.14			
347	8.60	1	-2.98	64.39	4	0.88	16.59	1	0.56															
348	9.29	2	0.97	64.49	3	1.03	16.54	1	0.21				45.70	1	1.34	55.80	1	0.81						
349	9.03	1	-0.51	64.23	2	0.63	16.49	1	-0.14				45.93	1	1.55	56.01	1	0.91						
350	9.51	1	2.23	63.73	4	-0.13	16.44	1	-0.49												32.9	1	1.52	
351	9.52	1	2.29	63.87	4	0.07	16.30	1	-1.49															
352	8.65	1	-2.69	62.85	4	-1.50	16.67	1	1.13															
353	9.25	1	0.74	69.01	3	8.04	16.30	1	-1.49	97.3	1	-0.35	44.07	1	-0.16	54.28	1	0.08			33.3	1	1.77	
354	9.07	1	-0.28	64.38	4	0.86	16.48	1	-0.21	0.83	2	1.23												
355	8.82	1	-1.72	63.92	4	0.15	16.42	1	-0.63				45.00	1	0.69	53.58	1	-0.24						
356	9.00	1	-0.68	65.30	1	2.29	16.34	1	-1.20	0.72	2	-0.46	114.7	1	2.42	43.80	1	-0.41	54.70	1	0.28	29.0	1	-0.95
357	9.15	1	0.17	64.07	4	0.38	16.65	1	0.99															
402	9.27	1	0.86	64.06	3	0.37	16.53	1	0.14	0.70	2	-0.77	93.1	1	-1.02									
403	9.14	1	0.11	65.63	3	2.80	16.83	1	2.27															
404	9.06	1	-0.34	65.05	2	1.90	16.07	1	-3.12															
404				67.02	3	4.96																		
405	9.18	1	0.34	64.02	4	0.31	16.39	1	-0.85				118.5	1	3.03									
406	9.26	1	0.80	65.37	3	2.40	16.79	1	1.98				41.52	1	-2.52	53.89	1	-0.10						
408													44.50	2	0.23	55.90	2	0.86						
409				64.71	3	1.38																		
410	9.45	2	1.89	64.62	3	1.24	16.31	2	-1.42															
410				64.78	3	1.48																		
411	9.37	1	1.43	63.61	4	-0.32	16.55	1	0.28															
412				64.91	3	1.69																		
413	9.27	1	0.86	62.92	3	-1.39	16.29	1	-1.56															
414																								
415	9.10	1	-0.11	62.70	2	-1.73	16.16	1	-2.48	0.83	1	1.23	99.7	1	0.03	44.91	1	0.61	57.64	1	1.69	31.5	1	0.63
416																								
417	9.19	1	0.40	64.04	2	0.34	16.44	1	-0.49				43.62	1	-0.57	51.23	1	-1.37						
426	9.37	1	1.43	62.48	2	-2.07	16.44	1	-0.49															

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

水分	粗たん白質	粗灰分	カドミウム	エトキシキン	銅	亜鉛
No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法
1 飼料分析基準	1 硫酸標準液吸収法	1 飼料分析基準	1 溶媒抽出法	1 LC法	1 飼料分析基準	1 飼料分析基準
2 水分測定器	2 ホウ酸溶液吸収法	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 LC法

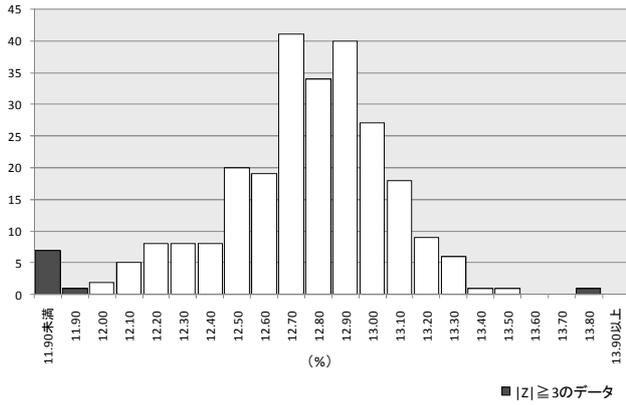


図 1 水分の分析成績 (A 試料)

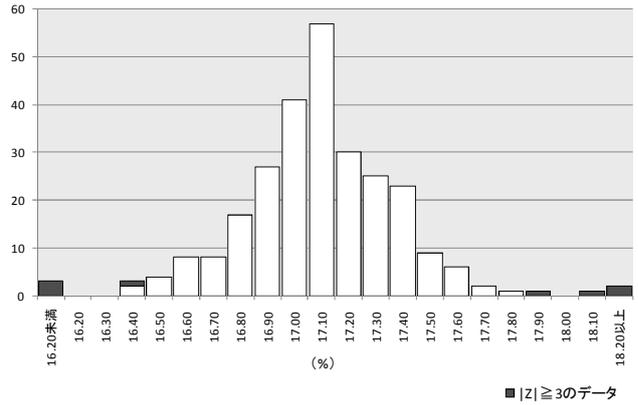


図 2 粗たん白質の分析成績 (A 試料)

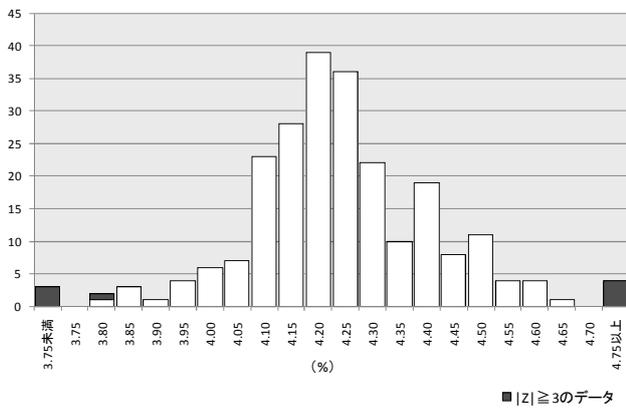


図 3 粗脂肪の分析成績 (A 試料)

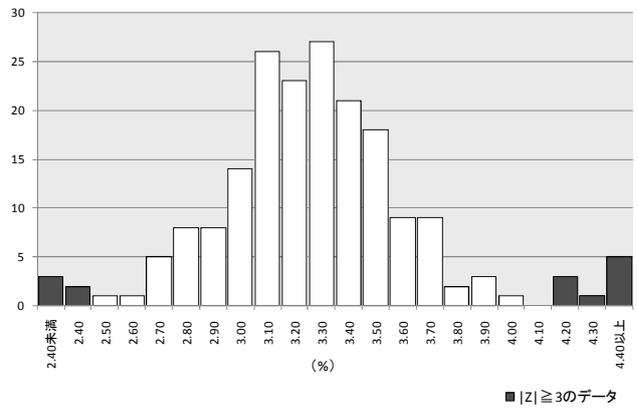


図 4 粗繊維の分析成績 (A 試料)

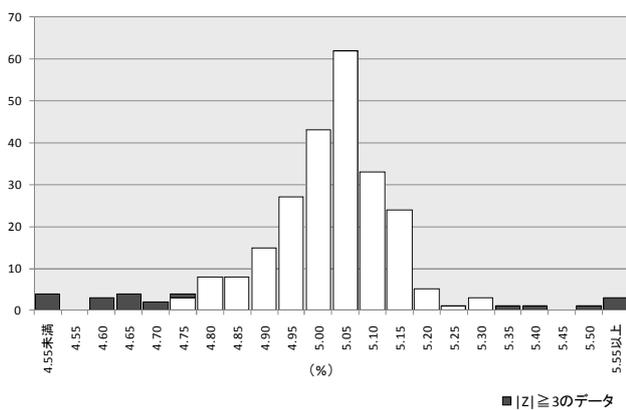


図 5 粗灰分の分析成績 (A 試料)

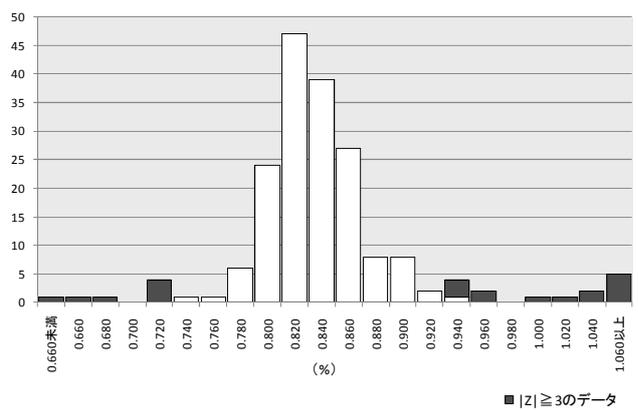


図 6 カルシウムの分析成績 (A 試料)

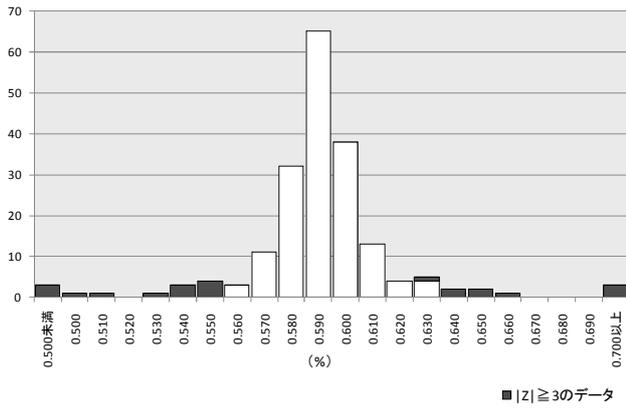


図 7 リンの分析成績 (A 試料)

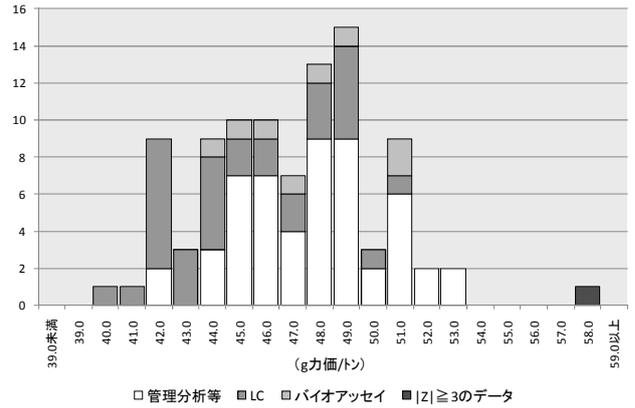


図 8 サリノマイシンナトリウムの分析成績 (A 試料)

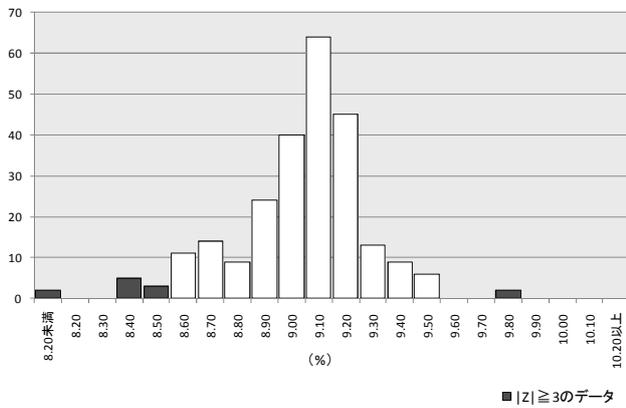


図 9 水分の分析成績 (B 試料)

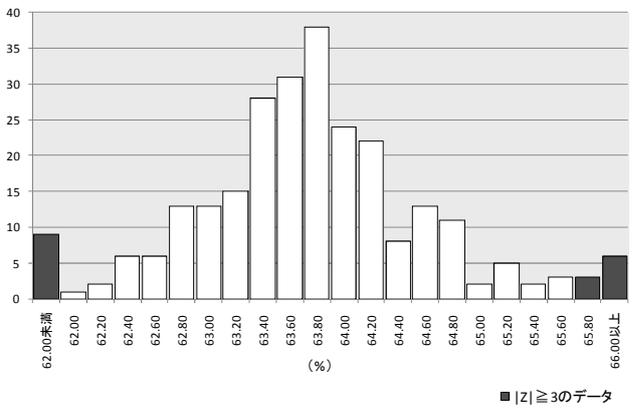


図 10 粗たん白質の分析成績 (B 試料)

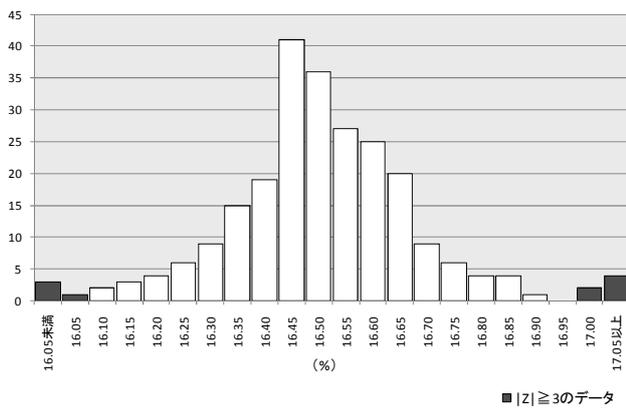


図 11 粗灰分の分析成績 (B 試料)

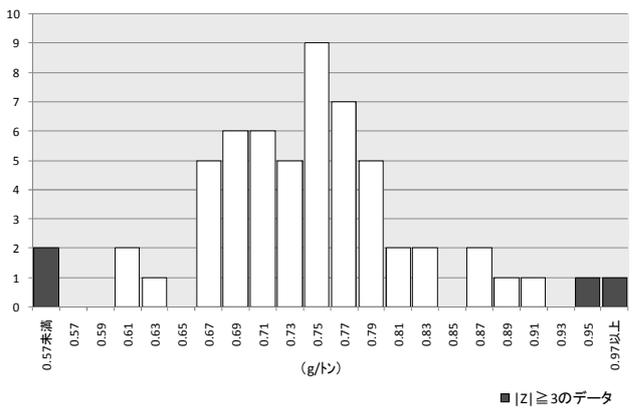


図 12 カドミウムの分析成績 (B 試料)

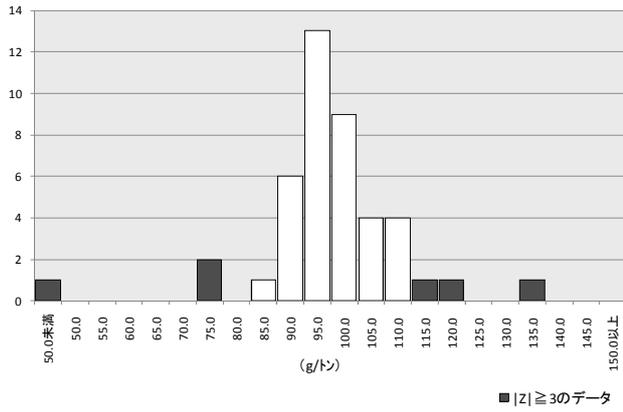


図 13 エトキシキンの分析成績 (B 試料)

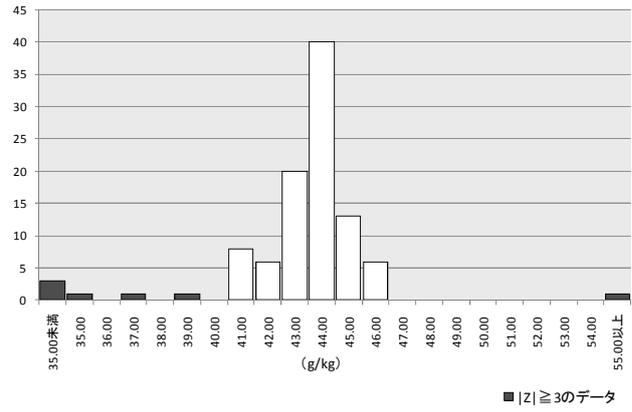


図 14 銅の分析成績 (D 試料)

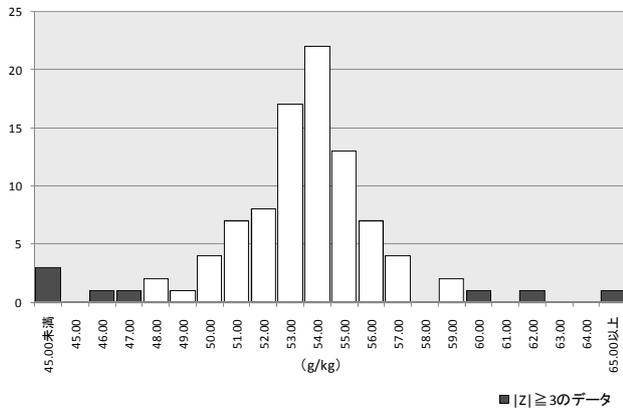


図 15 亜鉛の分析成績 (D 試料)

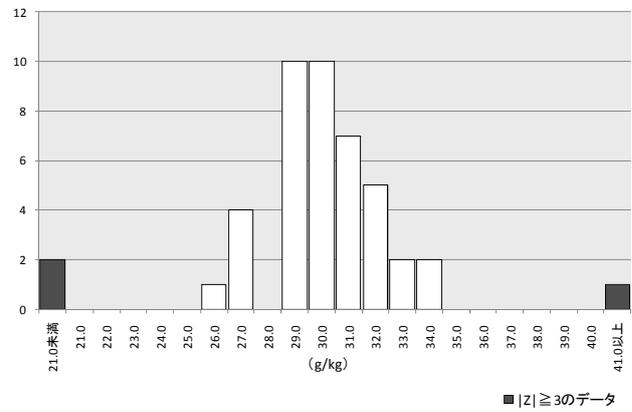


図 16 クエン酸モランテルの分析成績 (D 試料)

表 6 A 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	水分	粗たん白質	粗脂肪	粗繊維	粗灰分
データ数	256	268	235	190	252
1 中央値	12.82	17.13	4.25	3.31	5.05
1 下限境界値 ^{注2}	12.03	16.41	3.83	2.46	4.76
1 上限境界値	13.61	17.85	4.67	4.15	5.34
2 平均值	12.81	17.13	4.26	3.30	5.04
2 95%信頼区間	12.78~12.85	17.10~17.16	4.24~4.28	3.26~3.34	5.03~5.06

区 分	カルシウム	リン	SL(管理分析等) ^{注3}	SL(LC等) ^{注4}
データ数	185	192	54	41
1 中央値	0.842	0.596	48.6	45.9
1 下限境界値 ^{注2}	0.740	0.558	40.2	33.2
1 上限境界値	0.944	0.633	56.9	58.6
2 平均值	0.843	0.596	48.2	46.1
2 95%信頼区間	0.839~0.848	0.594~0.598	47.5~48.9	45.2~47.1

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

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

3 SL (管理分析等) は、サリノマイシンナトリウムの管理分析及びフローインジェクション法を集計した結果である。

4 SL (LC 等) は、サリノマイシンナトリウムの LC 法及びバイオアッセイを集計した結果である。

表 7 B 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	水分	粗たん白質	粗灰分	カドミウム	エトキシキン
データ数	247	261	241	58	43
1 中央値	9.12	63.82	16.51	0.75	99.5
1 下限境界値 ^{注2}	8.60	61.89	16.09	0.56	80.7
1 上限境界値	9.64	65.75	16.93	0.94	118.3
2 平均值	9.10	63.84	16.52	0.75	100.4
2 95%信頼区間	9.08~9.13	63.75~63.92	16.50~16.54	0.73~0.77	98.4~102.4

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

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 8 D 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	銅	亜鉛	クエン酸モランテル
データ数	100	94	44
1 中央値	44.25	54.10	30.5
1 下限境界値 ^{注2}	41.00	47.83	25.8
1 上限境界値	47.49	60.37	35.2
2 平均值	44.18	54.05	30.6
2 95%信頼区間	43.93~44.42	53.61~54.49	30.0~31.1

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

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 9 原料別検出状況

原 料 名	配合割合 (%)	試 験 室 数					検出率 (%)
		検 出			不検出	計	
		多量	中量	少量			
とうもろこし	30	138	5	0	143	0	100
小麦	10	9	53	15	77	66	54
マイロ	10	15	74	38	127	16	89
精白米	10	20	86	17	123	20	86
大豆油かす	9	9	108	17	134	9	94
ごま油かす	9	3	59	18	80	63	56
アルファルファミール	8	14	104	19	137	6	96
米ぬか	7	2	51	30	83	60	58
魚粉	3	4	45	80	129	14	90
りん酸カルシウム	2	3	1	107	111	32	78
食塩	2	3	1	131	135	8	94

表 10 配合したもの以外に検出と報告された原料

検出物名	多量	中量	少量	計
あまに油かす	0	15	9	24
えん麦	0	3	4	7
大麦	1	13	6	20
かき殻	0	0	2	2
かに殻粉末	0	1	0	1
カボック油かす	1	1	2	4
キャッサバ	0	0	1	1
玄米	0	3	1	4
コーングルテンフィード	0	3	2	5
小麦粉	0	1	1	2
サフラワー油かす	0	0	2	2
スクリーニングペレット	1	1	2	4
ゼオライト	0	0	2	2
炭酸カルシウム	0	0	26	26
チキンミール	0	1	7	8
なたね油かす	6	42	25	73
肉骨粉	0	1	1	2
ビートパルプ	2	7	3	12
フェザーミール	0	0	2	2
ふすま	0	44	15	59
ホミニフィード	0	1	0	1
綿実油かす	0	2	1	3
やし油かす	0	3	2	5
ライ麦	1	8	4	13

8 ま と め

(1) A 試料 (中すう育成用配合飼料)

1) 水分

256 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 9 件であった。これらのデータを除いた平均値は 12.81 %、95 %信頼区間は 12.78~12.85 %であった。

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

飼料分析基準による試験では、250 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 9 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 12.81 %、0.28 %及び 2.2 %であった。

水分測定器を使用した試験では、5 件のデータが報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 12.87 %、0.27 %及び 2.1 %であった。

その他の方法 (NIR による測定) によるデータが 1 件報告された。

2) 粗たん白質

268 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 8 件であった。これらのデータを除いた平均値は 17.13 %、95 %信頼区間は 17.10~17.16 %であった。

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

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法による試験では、30 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 17.07 %、0.23 %及び 1.4 %であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法による試験では、47 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 17.12 %、0.30 %及び 1.7 %であった。

飼料分析基準・燃焼法による試験では、54 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 17.21 %、0.27 %及び 1.6 %であった。

自動分析機を使用した試験では、137 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 17.13 %、0.22 %及び 1.3 %であった。

3) 粗脂肪

235 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 8 件であった。これらのデータを除いた平均値は 4.26 %、95 %信頼区間は 4.24~4.28 %であった。

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

飼料分析基準による試験では、167 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 7 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 4.29 %、0.14 %及び 3.4 %であった。

自動分析機を使用した試験では、67 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 4.17 %、0.10 %及び 2.5 %であった。

その他の方法 (抽出及び乾燥の時間が飼料分析基準と異なる方法) によるデータが 1 件報告された。

4) 粗繊維

190 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 14 件であった。これらのデータを除いた平均値は 3.30 %、95 %信頼区間は 3.26~3.34 %であった。

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

飼料分析基準・静置法による試験では、32 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.26 %、0.21 %及び 6.5 %であった。

飼料分析基準・ろ過法による試験では、107 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 8 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.22 %、0.29 %及び 9.1 %であった。

自動分析機を使用した試験では、47 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.48 %、0.23 %及び 6.6 %であった。

その他の方法 (自動分析ではない粗繊維測定用機器を用いた方法) によるデータが 4 件報告された。

5) 粗灰分

252 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 20 件であった。これらのデータを除いた平均値は 5.04 %、95 %信頼区間は 5.03~5.06 %であった。

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

飼料分析基準による試験では、247 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 21 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 5.05 %、0.10 %及び 1.9 %であった。

その他の方法 (加熱方法及び時間が飼料分析基準と異なる方法、自動分析装置による測定等) によるデータが 5 件報告された。

6) カルシウム

185 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 21 件であった。これらのデータを除いた平均値は 0.843 %、95 %信頼区間は 0.839~0.848 %であった。

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

飼料分析基準・シュウ酸アンモニウム法による試験では、39 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 7 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.858 %、0.039 %及び 4.6 %であった。

飼料分析基準・原子吸光光度法による試験では、138 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.841 %、0.029 %及び 3.5 %であった。

その他の方法 (ICP による測定、キレート滴定法等) によるデータが 8 件報告された。

7) リン

192 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 22 件であった。これらのデータを除いた平均値は 0.596 %、95 %信頼区間は 0.594~0.598 %であった。

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

飼料分析基準による試験では、184 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 23 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.595 %、0.011 %及び 1.9 %であった。

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

8) サリノマイシンナトリウム

今回の試験ではサリノマイシンナトリウム無添加試料の配布がなく、その差を差し引くことになっていないため、管理分析及びフローインジェクションによる試験と LC 法及びバイオアッセイによる試験とで差が生じることが考えられ、両者を分けて集計した。

管理分析及びフローインジェクションによる試験では、54 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件であった。このデータを除いた平均値は 48.2 g(力価)/トン、95 %信頼区間が 47.5~48.9 g(力価)/トンであった。

LC 法及びバイオアッセイによる試験では、41 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものはなかった。その平均値は 46.1 g(力価)/トン、95 %信頼区間は 45.2~47.1 g(力価)/トンであった。

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

管理分析法による試験では、44 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件) が

報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 48.0 g(力価)/トン、2.4 g(力価)/トン及び 5.0 %であった。

フローインジェクションによる試験では、10 件のデータが報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 48.9 g(力価)/トン、3.2 g(力価)/トン及び 6.5 %であった。

飼料分析基準・LC 法による試験では、33 件のデータが報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 45.6 g(力価)/トン、3.0 g(力価)/トン及び 6.5 %であった。

飼料分析基準・バイオアッセイによる試験では、8 件のデータが報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 48.2 g(力価)/トン、2.5 g(力価)/トン及び 5.1 %であった。

(2) B 試料 (魚粉)

1) 水分

247 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 12 件であった。これらのデータを除いた平均値は 9.10 %、95 %信頼区間は 9.08~9.13 %であった。

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

飼料分析基準による試験では、241 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 9.10 %、0.20 %及び 2.2 %であった。

水分測定器を使用した試験では、5 件のデータが報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 9.25 %、0.13 %及び 1.4 %であった。

その他の方法 (NIR による測定) によるデータが 1 件報告された。

2) 粗たん白質

261 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 18 件であった。これらのデータを除いた平均値は 63.84 %、95 %信頼区間は 63.75~63.92 %であった。

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

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法による試験では、27 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 63.78 %、0.91 %及び 1.4 %であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法による試験では、45 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 63.71 %、0.76 %及び 1.2 %であった。

飼料分析基準・燃焼法による試験では、54 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 4 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 64.42 %、0.68 %及び 1.1 %であった。

自動分析機を使用した試験では、135 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 63.70 %、0.49 %及び 0.8 %であった。

3) 粗灰分

241 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件であった。これらのデータを除いた平均値は 16.52 %、95 %信頼区間は 16.50~16.54 %であった。

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

飼料分析基準による試験では、236 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 16.53 %、0.14 %及び 0.9 %であった。

その他の方法 (加熱方法及び時間が飼料分析基準と異なる方法、自動分析装置による測定等) によるデータが 4 件報告された。

4) カドミウム

58 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 4 件であった。これらのデータを除いた平均値は 0.75 mg/kg、95 %信頼区間は 0.73~0.77 mg/kg であった。

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

飼料分析基準・溶媒抽出法による試験では、18 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.80 mg/kg、0.05 mg/kg 及び 5.9 %であった。

飼料分析基準・簡易法による試験では、39 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.73 mg/kg、0.05 mg/kg 及び 6.5 %であった。

その他の方法 (ICP による測定) によるデータが 1 件報告された。

5) エトキシキン

43 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件であった。これらのデータを除いた平均値は 100.4 mg/kg、95 %信頼区間は 98.4~102.4 mg/kg であった。

なお、分析方法はすべて飼料分析基準 (LC 法) による試験であった。その標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 6.2 mg/kg 及び 6.1 %であった。

(3) D 試料（子豚育成用プレミックス）

1) 銅

100 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 7 件であった。これらのデータを除いた平均値は 44.18 g/kg, 95 %信頼区間は 43.93~44.42 g/kg であった。

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

飼料分析基準による試験では、97 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 7 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 44.21 g/kg, 1.19 g/kg 及び 2.7 %であった。

その他の方法（ICP による測定等）によるデータが 3 件報告された。

2) 亜鉛

94 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 8 件であった。これらのデータを除いた平均値は 54.05 g/kg, 95 %信頼区間は 53.61~54.49 g/kg であった。

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

飼料分析基準による試験では、91 件のデータ (z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 8 件) が報告され、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 54.12 g/kg, 2.00 g/kg 及び 3.7 %であった。

その他の方法（ICP による測定等）によるデータが 3 件報告された。

3) クエン酸モランテル

44 件のデータの報告があり、ロバスト法による z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件であった。これらのデータを除いた平均値は 30.6 g/kg, 95 %信頼区間は 30.0~31.1 g/kg であった。

なお、分析方法はすべて飼料分析基準（LC 法）による試験であった。その標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 1.8 g/kg 及び 6.0 %であった。

(4) C 試料（鑑定用試料）

鑑定

11 種類の配合された原料の検出とその配合割合の推定を行うこととした。143 試験室より報告があり、配合した 11 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（配合割合 30 %）では、143 試験室（検出率 100 %）から報告があり、その内訳は多量（15 %以上、以下同じ）との報告した試験室が 138、中量（5 %以上~15 %未満、以下同じ）と報告した試験室が 5 であった。

小麦（配合割合 10 %）では、77 試験室（検出率 54 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 9、中量と報告した試験室が 53、少量（1 %以上~5 %未満、以下同じ）

と報告した試験室が 15 であった。

マイロ（配合割合 10 %）では、127 試験室（検出率 89 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 15、中量と報告した試験室が 74、少量と報告した試験室が 38 であった。

精白米（配合割合 10 %）では、123 試験室（検出率 86 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 20、中量と報告した試験室が 86、少量と報告した試験室が 17 であった。

大豆油かす（配合割合 9 %）では、134 試験室（検出率 94 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 9、中量と報告した試験室が 108、少量と報告した試験室が 17 であった。

ごま油かす（配合割合 9 %）では、80 試験室（検出率 56 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 3、中量と報告した試験室が 59、少量と報告した試験室が 18 であった。

アルファルファミール（配合割合 8 %）では、137 試験室（検出率 96 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 14、中量と報告した試験室が 104、少量と報告した試験室が 19 であった。

米ぬか（配合割合 7 %）では、83 試験室（検出率 58 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 2、中量と報告した試験室が 51、少量と報告した試験室が 30 であった。

魚粉（配合割合 3 %）では、129 試験室（検出率 90 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 4、中量と報告した試験室が 45、少量と報告した試験室が 80 であった。

りん酸カルシウム（配合割合 2 %）では、111 試験室（検出率 78 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 3、中量と報告した試験室が 1、少量と報告した試験室が 107 であった。

食塩（配合割合 2 %）では、135 試験室（検出率 94 %）から報告があり、その内訳は多量と報告した試験室が 3、中量と報告した試験室が 1、少量と報告した試験室が 131 であった。

誤って検出したものについては、なたね油かすが最も多く、73 試験室から報告があった。次いで、ふすまが 59 試験室、炭酸カルシウムが 26 試験室、あまに油かすが 24 試験室の順で多く報告された。

文 献

- 1) Michael Thompson, Roger Wood: The international harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories, Pure Appl. Chem., 65(9), 2123-2144 (1993).

(参考)

平成 22 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領

1. 目的

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

2. 共通試料の内容

A 試料…中すう育成用配合飼料

B 試料…魚粉

C 試料…鑑定用飼料原料調製試料

D 試料…子豚育成用プレミックス

3. 分析・鑑定項目

A 試料・・・水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム、リン及びサリノマイシンナトリウム

B 試料・・・水分、粗たん白質、粗灰分、カドミウム及びエトキシキン

C 試料・・・11 種類の原料の配合割合の推定

D 試料・・・銅、亜鉛及びクエン酸モランテル

4. 分析・鑑定要領

- (1) 試料の分析・鑑定方法は、「飼料分析基準」(平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号農林水産省消費・安全局長通知)に定める方法及び「サリノマイシンナトリウム又はモネンシンナトリウムを含む飼料の管理方法」(「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」(昭和 53 年 9 月 5 日付け 53 畜 B 第 2173 号、53 水振第 464 号農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知)の別記)に準拠してください。

なお、参考までに分析法を添付します。

また、各分析方法の末尾に、分析試料採取量等の一例を記載しました。

- (2) 上記 3 に示した分析・鑑定項目のうち、各試験室において実施可能な項目(全項目でなくても可)について分析・鑑定を行い、報告してください。
- (3) サリノマイシンナトリウムについて、液体クロマトグラフによる定量法及び微生物学的定量法による分析が可能な試験室は、参考までに、分析を実施するようお願いします。
- (4) B 試料のエトキシキンの分析における標準品は、今回配布したものを使用してください。(当該標準品は冷蔵庫に保管してください。)
- (5) 分析試料は冷蔵庫に保管し、使用する際には常温に戻してから供試してください。
- (6) 複数の方法(例えば粗たん白質におけるケルダール法及び燃焼法)で分析した場合は、それぞれのデータを報告してください。

5. 分析鑑定成績の報告

(1) 報告は、別添の「飼料等の共通試料による分析鑑定成績報告書」の様式により、分析又は鑑定を実施した項目について記載し、報告してください。

(2) 分析値は、水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム及びリンについては%で、サリノマイシンナトリウムについてはg(力価)/トンで、銅、亜鉛及びクエン酸モランテルについてはg/kgで、カドミウム、エトキシキンについてはg/トンで表してください。

水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カドミウム、銅及び亜鉛の分析値は小数点以下第3位を四捨五入して同第2位まで、カルシウム及びリンの分析値は小数点以下第4位を四捨五入して同第3位まで、サリノマイシンナトリウム、エトキシキン及びクエン酸モランテルの分析値は小数点以下第2位を四捨五入して同第1位まで記入してください。

分析方法及び使用した分析機器等を備考欄の該当する番号に○印を付し、その詳細を様式に従って記載してください。

また、分析上の特記事項があれば、その旨も記載してください。

なお、参考のため、クエン酸モランテル及びエトキシキンについては、標準液及び試料溶液のクロマトグラムを各1葉添付してください。

(3) 鑑定成績は、検出物欄に検出した原料名を分析鑑定成績報告書(4)の語群から選んで記入し、推定される配合割合は、多量(15%以上)、中量(5%以上15%未満)及び少量(1%以上5%未満)欄に○印を付してください。1%未満と推定される検出物は、検出物欄に記入しないでください。なお、C試料には11種類の原料が配合されています。

検出方法は、該当する番号に○印を付してください。(複数可)

(4) 一部の成分を別の事業所(研究所等)で実施した場合は、その事業所名を備考欄に記入してください。

(5) 報告書の提出期限及び送付先

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

飼料等の共通試料による分析鑑定成績報告書 (様式)

試験室名

担当者

TEL

(1) A 試料 分析成績

試料番号

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1. 飼料分析基準 2. 水分測定器 (メーカー) (型式) 3. その他の方法 ()
粗たん白質	(%)	1. 飼料分析基準 (硫酸標準液吸収法) 2. 飼料分析基準 (ホウ酸溶液吸収法) 3. 飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4. 自動分析機 (メーカー) (型式) 5. その他の方法 ()
粗脂肪	(%)	1. 飼料分析基準 2. 自動分析機 (メーカー) (型式) 3. その他の方法 ()
粗繊維	(%)	1. 飼料分析基準 (静置法) 2. 飼料分析基準 (ろ過法) 3. 自動分析機 (メーカー) (型式) 4. その他の方法 ()
粗灰分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
カルシウム	(%)	1. 飼料分析基準 (シュウ酸アンモニウム法) 2. 飼料分析基準 (原子吸光光度法) 3. その他の方法 ()
リン	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
サリノマイ シンナトリ ウム	(g(カ匁)/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. LC 法 (参考) (g(カ匁)/トン) LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μ m) 4. 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. 自動分析装置 (メーカー) (型式) 5. その他の方法 ()
粗灰分	(%)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
カドミウム	(g/ト)	1. 飼料分析基準 (溶媒抽出法) 2. 飼料分析基準 (簡易法) 3. その他の方法 ()
エトキシキン	(g/ト)	1. 飼料分析基準 測定条件 LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 2. その他の方法 ()

(3) D試料 分析成績

試料番号 _____

分析成分名	分析値	備 考
銅	(g/kg)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
亜鉛	(g/kg)	1. 飼料分析基準 2. その他の方法 ()
クエン酸 モランテル	(g/kg)	1. 飼料分析基準 測定条件 LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 2. その他の方法 ()

(4) C 試料 鑑定成績

試料番号 _____

検出物 <small>(語群から選択してください)</small>	配合割合	検出方法
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他()

多量…15%以上、中量…5%以上 15%未満、少量…1%以上 5%未満
 注) 11 種類の原料が配合されています。

検出物の語群

大麦	えん麦	ライ麦	小麦	小麦粉
とうもろこし	マイロ	玄米	精白米	キャッサバ
ふすま	麦ぬか	米ぬか	ビールかす	コーングルテンフィード
スクリーニングベレット	ホミニーフード	コーングルテンミール	あまに油かす	サフラワー油かす
なたね油かす	綿実油かす	やし油かす	ごま油かす	大豆油かす
カポック油かす	肉骨粉	フェザーミール	チキンミール	魚粉
アルファルファミール	ビートパルプ	かに殻粉末	かき殻	ゼオライト
食塩	炭酸カルシウム	リン酸カルシウム		

(5) 来年度の実施項目等「飼料等の共通試料による分析鑑定」に関して、意見、質問、要望等があれば記入してください。(別紙でも可)

調査資料**1 飼料中の有害物質等のモニタリング結果について（平成 22 年度）**

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課
飼料鑑定第二課

1 目 的

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

（独）農林水産消費安全技術センター（FAMIC）では、これらの有害物質等の基準・規格への適合状況の確認及び基準・規格が設定されていないその他の有害物質等の飼料中の汚染実態等を把握するためのモニタリングを実施しており、平成 22 年度に実施したモニタリングの結果について取りまとめたので報告する。

2 方 法**2.1 試 料**

FAMIC 肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センターが、飼料安全法第 57 条の規定に基づき、平成 22 年 4 月から平成 23 年 3 月までに各管内の飼料原料工場、配合飼料工場及び港湾サイロ等に対して実施した飼料立入検査の際に採取した飼料等についてモニタリングを実施した。

モニタリングを行った試料及び点数は表 1 のとおりである。

2.2 モニタリング実施項目

以下の 1)~3)の各項目について、モニタリングを実施した。

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

1) 有害物質**i かび毒及びエンドファイト産生毒素（18 成分）****ア 飼料中の基準値又は暫定許容値が設定されている 3 成分****① アフラトキシン B₁**

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

② デオキシニバレノール

飼料中のデオキシニバレノールについて（平成 14 年 7 月 5 日付け 14 生畜第 2267 号

農林水産省生産局畜産部飼料課長通知）で暫定許容値が設定されている家畜等用飼料及びその他汚染の可能性のある飼料原料についてモニタリングを実施した。

なお、暫定許容値については、飼料中のデオキシニバレノールの平成 22 年度中の取扱いについて（平成 22 年 10 月 6 日付け 22 消安第 5364 号農林水産省消費・安全局畜産安全管理課長通知）により、平成 22 年度中に限っての新たな暫定許容値が設定されたことから、22 年 10 月からはこれに基づくモニタリングを実施した。

③ ゼアラレノン

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

イ その他 15 成分

アのかび毒以外で、「飼料分析基準」（平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号農林水産省消費・安全局長通知）に分析法が収載されている以下のかび毒及びエンドファイト産生毒素 15 成分についてモニタリングを実施した。

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

エンドファイト産生毒素：エルゴバリン及びロリトレム B

ii 重金属（4 成分）

指導基準で基準値が設定されている飼料中のカドミウム、鉛、水銀及びヒ素について、モニタリングを実施した。

iii 農薬（139 成分）

ア 飼料中の基準値が設定されている 38 成分

飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年 7 月 24 日付け農林省令第 35 号。以下「成分規格等省令」という）別表第 1 の 1 の(1)飼料一般の成分規格のセに基準値が設定されている農薬のうちの 38 成分について、モニタリングを実施した。

イ その他 101 成分

アの農薬以外で、飼料分析基準に分析法が収載されている農薬のうちの 101 成分について、モニタリングを実施した。

iv その他の有害物質（5 成分）

最近、飼料の汚染又は混入事例が認められて問題となった以下の有害物質 5 成分についてモニタリングを実施した。

ア 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

イ ヒスタミン

ウ マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン

2) BSE 発生防止に係る試験

i 牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験

成分規格等省令別表第 1 の 2 の基準・規格に規定された飼料中への動物由来たん白質の混入の有無を確認するために、肉骨粉の顕微鏡鑑定、動物由来たん白質及び動物由来 DNA の定性試験を実施した。

ii 不溶性不純物

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

3) 病原微生物

i サルモネラ

配混合飼料及び飼料原料についてモニタリングを実施した。

表1 モニタリングを行った試料及び点数

モニタリングを行った試料	種 類	点数	項目別の試料点数							
			有 害 物 質			BSE発生防止に係る試験			病原微生物	
			かび毒	重金属	農薬	硝酸態窒素・亜硝酸態窒素	ヒスタミン	マラカイトグリーン等		動物由来たん白質
顕微鏡鑑定	ELISA試験	PCR試験	不溶性不純物	サルモネラ						
幼すう育成用	9	6	3	6						4
中すう育成用	10	5	4	7						5
大すう育成用	6	4	4	3						2
成鶏飼育用	76	38	37	43						31
ブロイラー肥育前期用	12	7	2	7						3
ブロイラー肥育後期用	28	12	13	20						8
種鶏飼育用	3	1	2	3						2
鶏複数ステージ用	2	1	1	1						2
ほ乳期子豚育成用	27	23	10	10						10
子豚育成用	29	19	12	15						9
肉豚肥育用	34	24	6	19						11
種豚育成用	2		2	1						2
種豚飼育用	24	14	8	19						6
豚複数ステージ用	5	2	2	3						2
配混合飼料										
ほ乳期子牛育成用代用乳用	7	1	2				7			2
ほ乳期子牛育成用	7	5	3	1			7	4	4	1
若令牛育成用	14	8	3	10			14	12	12	4
乳用牛飼育用	53	40	16	30			53	46	46	23
幼令肉用牛育成用	6	2	1	4			6	5	5	
肉用牛肥育用	69	36	16	42			68	57	57	14
乳肉用牛飼育用	1			1			1	1	1	
肉牛繁殖用	8	3	2	3			8	8	8	3
種牛飼育用	4	1	2	3			4	4	4	2
牛複数ステージ用	29	20	6	18			29	20	20	3
魚用(対象魚を限定しないもの)	1						1	1	1	1
とうもろこし・魚粉二種混合飼料	1	1								
二種混(上記以外のもの)	2						2	2	2	
動物性たん白質混合飼料	4						4	4	4	3
糖蜜吸着飼料	1						1	1	1	1
上記以外の混合飼料	67						67	66	66	6
小 計	541	275	157	272			272	231	231	158
穀類										
とうもろこし	120	120		36						
マイロ	1	1		1						
小麦	7	6		7						
大麦	18	16		16						
圧べん大麦	1	1		1						
えん麦	1	1		1						
ライ麦	2	1		2						
圧べん大豆	2	1		1						
エクストルーダ処理大豆	1			1						
キャッサバ	1	1		1						
小麦粉	1	1		1						
甘しょ	1			1						
きな粉	1	1		1						
末粉	2	1		1						
小 計	159	151		70						
そうこう類										
米ぬか(油かす)	10	3		5						4
ふすま	33	19		27						5
脱脂ぬか	7	6		4						
麦ぬか	1	1		1						
コーングルテンフィード	22	22		17						1
とうもろこしジスチン化デンプン(DDGS)	8	8		5						
大豆皮	1	1		1						
スクリーニングペレット	1	1		1						
ホミニフィード	2	2								
ビールかす	2	1		1						1
しょう油かす	1			1						
小 計	88	64		63						11

表 1 モニタリングを行った試料及び点数（続き）

モニタリングを行った試料		項目別の試料点数										
		有害物質			BSE発生防止に係る試験			病原微生物				
種類	点数	かび毒	重金属	農薬	硝酸態窒素・亜硝酸態窒素	ヒスタミン	マラカイトグリーン等	動物由来たん白質			不溶性不純物	サルモネラ
								顕微鏡鑑定	ELISA試験	PCR試験		
植物性油かす類	大豆油かす	75	45	57								14
	なたね油かす	29	13	25								7
	やし油かす	2	2	1								
	ごま油かす	2	2	1								1
	コーングルテンミール	26	26	12								1
	コーンジャムミール	1	1									
	エクストルーダ処理大豆油かす	1										1
	ポテトプロテイン	1	1									
小計	137	90	96									24
動物質性飼料	魚粉	102		32		16	27	88	88	88		75
	豚肉骨粉	2		2					2	2		2
	チキンミール	28		10				28	28	28		22
	フェザーミール	16						16	16	16		12
	原料混合肉骨粉	32		6					32	32		16
	血粉	3						3	3	3		
	フィッシュソリュブル	1						1	1	1		
	イカミール	1						1	1	1		1
小計	185		50			16	27	137	171	171		128
乾牧草	アルファルファ	9		9	8							
	チモシー	7		7								
	スーダングラス	12		12	9							
	バミューダグラス	2		2								
	稲わら	4		4								
	オーツヘイ	5		5								
	フェスク	1	1	1								
	クレイングラス	2		2	1							
古畳わら	5		5									
小計	47	1	4	43	18							
その他	綿実	4	3	4								
	ビートパルプ	2	2	2								
	コーンコブミール	1	1	1								
	タピオカ澱粉	1	1									
	とうふかす	1	1									
	菓子くず	1	1									
	カカオ豆殻	1		1								
	動物性油脂	60										60
特定動物性油脂	2										2	
小計	73	9	8									62
合計	1,230	590	211	552	18	16	27	409	402	402	62	321

2.3 サンプルング方法等

1) 有害物質及び病原微生物試験用試料

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

試験用試料の調製及び保管は、飼料分析基準第 2 章の規定に従って行った。

2) 動物由来たん白質及び DNA 分析用試料

試料の採取、試験用試料の調製及び保管は、飼料分析基準第 16 章第 1 節の規定に従って実施した。

3) 動物性油脂及び特定動物性油脂

基準油脂分析試験法の試料採取方法¹⁾に準拠した次の方法により採取した。

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

2.4 試験方法

1) 有害物質

i かび毒及びエンドファイト産生毒素

飼料分析基準第 5 章の各方法により試験を実施した。

ii 重金属

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

iii 農薬

飼料分析基準第 6 章の各方法により試験を実施した。

iv 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

飼料分析基準第 4 章第 2 節 3 の方法により試験を実施した。

v ヒスタミン

飼料分析基準第 7 章 5 の 1 の方法により試験を実施した。

vi マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン

飼料分析基準第 8 章第 2 節 2 の方法により試験を実施した。

2) 牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験

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

i 顕微鏡鑑定

試験用試料中の獣骨及び獣毛等の有無を、図 1 の方法で光学顕微鏡を用い鑑定した。

ii ELISA 試験

牛由来たん白質は、「モリナガ加熱処理牛由来たん白質検出キット」（森永生科学研究所製）を用い、魚粉等及び国産の牛用配混合飼料を対象として定性試験を実施した。（飼料分析基準第 17 章第 2 節 1.1 の(2)）

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

家きん由来たん白質は、「モリナガ加熱処理鶏由来たん白質検出キット」（森永生科学研究所製）を用い、家きん由来たん白質の混入が懸念された魚粉等及び魚あらし入り発酵飼料を対象として定性試験を実施した。（飼料分析基準第 17 章第 2 節 2 の(2)）

iii PCR 試験

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

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

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

家きん由来たん白質の混入が懸念された魚粉等及び魚あらし入り発酵飼料については、家きん由来 DNA を対象に試験を実施した。（飼料分析基準第 16 章第 2 節 2）

試験の実施に当たっては、DNA の抽出確認のため同時にコントロールとなる DNA の検

出を確認した。（飼料分析基準第 16 章第 3 節 1～4）

また、乳製品等が原料として使用又は混入の可能性のある試料は、乳製品等除去処理を実施した。（飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 付記）

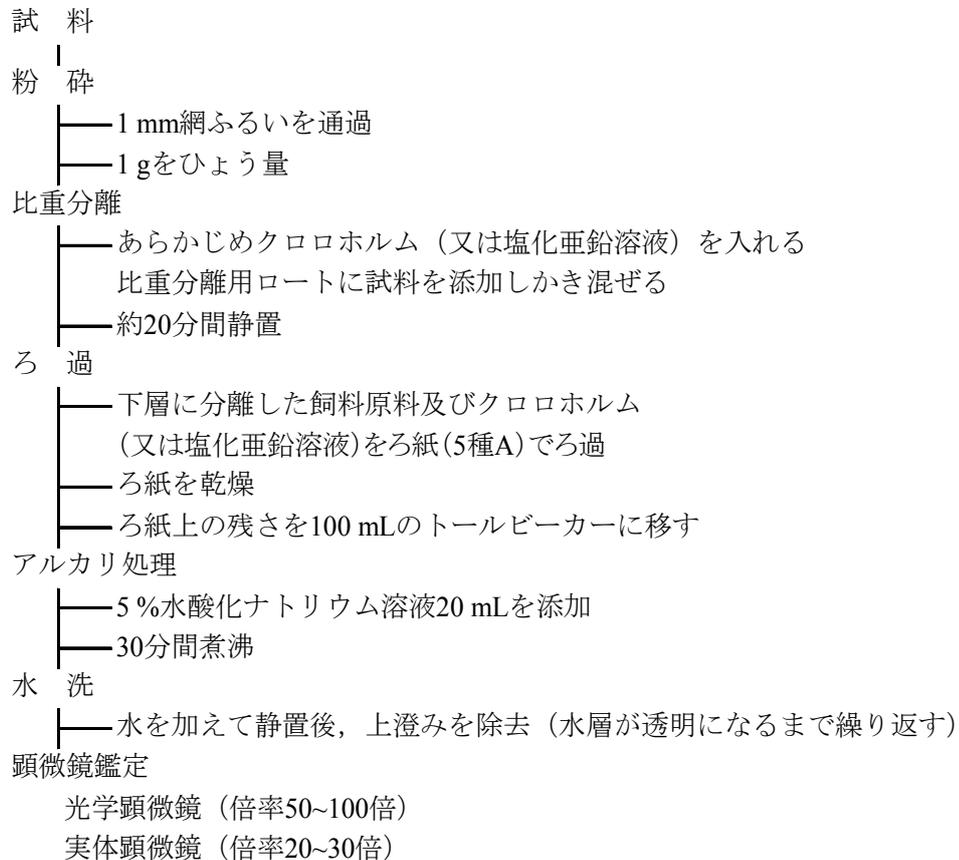


図 1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

3) 不溶性不純物

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

4) サルモネラ

試験用試料中の細菌を増菌培養し、サルモネラ選択培地を用いた選択分離培養後、確認培地によりサルモネラの検出を行った。分離サルモネラ菌株の血清型別を行った。（飼料分析基準第 18 章 1）

3 結 果

3.1 有害物質

1) かび毒及びエンドファイト産生毒素

基準値の設定されているアフラトキシン B₁、ゼアラレノン及びデオキシニバレノールを始め、計 18 成分について 5,676 点のモニタリングを実施した。その結果を表 2 に示した。

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

i アフラトキシシン B₁

配混合飼料 257 点中 118 点（検出率 45.9 %）から検出され、有害物質の指導基準を超えるものはなかったが、ほ乳期子豚育成用及び成鶏飼育用各 1 点から基準値レベルの数値が検出された。

原料では、とうもろこしの検出率は 37.6 %と例年とほぼ同程度であったが、検出値は最大値が 0.031 ppm で 0.020 ppm を超えたものが 3 点と、例年より高い数値であった。

また、とうもろこしの副産原料であるグルテンフィード、グルテンミールについても検出率はいずれも 50 %と例年とほぼ同程度であったが、最大検出値がそれぞれ 0.013 ppm, 0.030 ppm といずれも高濃度のものが見られた。

その他の原料では、コーンコブミール（タイ産）から 0.055 ppm, やし油かす（フィリピン産）から 0.030 ppm, 大豆油かす（インド産）から 0.007 ppm 検出されており、東南アジア等の熱帯、亜熱帯産原料を使用する際には留意が必要である。

ii デオキシニバレノール

平成 22 年度に日本に輸入されたとうもろこしの主体である 2009 年に収穫された米国産とうもろこしが、収穫時期の天候不良の影響によりデオキシニバレノールに高濃度汚染されていたため、モニタリングしたとうもろこしの検出率（98.3 %）及び検出値（最大値 3.6 ppm）ともに軒並み高くなった。

とうもろこしの副産原料も同様に検出率及び検出値が高く、コーングルテンフィード 86.4 %（最大値 7.2 ppm, 平均値 3.6 ppm）, コーングルテンミール 84.0 %（最大値 0.71 ppm, 平均値 0.30 ppm）, DDGS 85.7 %（最大値 8.4 ppm, 平均値 3.4 ppm）であった。特に、コーングルテンフィード及び DDGS は原料のとうもろこしよりも検出値が高い傾向にあり、加工工程を経ることによりデオキシニバレノールが濃縮されて残存しているものと考えられた。

上記の影響を受けて、配混合飼料は 214 点中 205 点（検出率 95.8 %）から検出され、例年にも増して高い検出率となった。これらの状況を踏まえ、飼料中のデオキシニバレノールについては、平成 22 年度中に限っての新たな暫定許容値が設定され³⁾、鶏用飼料で 3 ppm, 豚用及び牛（生後 3 ヶ月以上の牛を除く）用飼料で 1 ppm, 生後 3 ヶ月以上の牛用飼料で 5 ppm とされた。検出値で新たな暫定許容値を超えるものはなかったが、最大値は乳用牛飼育用で 2.2 ppm であり 1.0 ppm を超えたものが 18 点（割合 8.4 %）と高濃度の汚染が見られた。

上記以外では、小麦 60.0 %（最大値 1.9 ppm）, その副産原料のふすま 78.9 %（最大値 0.62 ppm）, 大豆油かす 38.1 %（最大値 1.1 ppm）等があり、これらの原料を使用する際には留意が必要である。

iii ゼアラレノン

家畜用配混合飼料 150 点中 141 点（検出率 94.0 %）から検出され、例年と同様に高い検出率であったが、暫定許容値を超えるものはなく最大値は乳用牛飼育用で 0.29 ppm であった。原料で検出率の高いものは、とうもろこしの 93.3 %（最大値 0.81 ppm）, その副産原料のコーングルテンフィード 90.0 %（最大値 0.82 ppm）, コーングルテンミール 88.0 %（最大値 6.4 ppm）, 小麦 80.0 %（最大値 0.20 ppm）等があり、これらの原料を使用する際には留意が必要である。

表2 かび毒及びエンドファイト産生毒素のモニタリング結果

モニタリング項目	モニタリングを行った 試料の種類	指導 基準値 (ppb)	モニタ リング 点数	うち検出されたもの			
				点 数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)
アフラトキシンB ₁ (検出下限 0.2 ppb)	配混合飼料（ほ乳期、幼令期用等）	1×10	95	38	40.0	11	1.9
	配混合飼料（上記以外）	2×10	162	80	49.4	20	2.1
	とうもろこし	—	93	35	37.6	31	5.2
	キャッサバ	—	1	1	100.0	0.3	0.3
	コーングルテンフィード	—	20	10	50.0	13	5.3
	DDGS	—	8	2	25.0	1	0.8
	コーングルテンミール	—	26	13	50.0	30	4.3
	大豆油かす	—	41	14	34.1	7	1.2
	やし油かす	—	2	2	100.0	36	20
	ビールかす	—	1	1	100.0	0.4	0.4
	綿実	—	3	1	33.3	4	4.0
	コーンコブミール	—	1	1	100.0	55	55
	上記以外の飼料原料24種類	—	75				
	計	—	528	198	37.5	55	3.3
デオキシニバレノール (検出下限 10 ppb)	配混合飼料（生後3ヶ月以上の牛用）	5×10 ³	73	72	98.6	2,200	730
	配混合飼料（豚用・上記以外の牛用）	1×10 ³	80	74	92.5	1,000	420
	配混合飼料（鶏用）	3×10 ³	61	59	96.7	1,200	450
	とうもろこし	—	120	118	98.3	3,600	660
	小麦	—	5	3	60.0	1,900	920
	大麦	—	12	5	41.7	71	40
	ふすま	—	19	15	78.9	620	290
	コーングルテンフィード	—	22	19	86.4	7,200	3,600
	コーングルテンミール	—	25	21	84.0	710	300
	DDGS	—	7	6	85.7	8,400	3,400
	大豆油かす	—	42	16	38.1	1,100	110
	上記以外の飼料原料25種類	—	46	8	17.4	180	
	計	—	512	416	81.3	8,400	700
	ゼアラレノン (検出下限 0.3 ppb)	配混合飼料（家畜用）	1×10 ³	150	141	94.0	290
配混合飼料（家きん用）		—	58	55	94.8	350	76
とうもろこし		—	90	84	93.3	810	100
小麦		—	5	4	80.0	200	68
大麦		—	11	3	27.3	71	25
米ぬか（油かす）		—	3	2	66.7	120	73
ふすま		—	19	12	63.2	13	6
脱脂ぬか		—	6	5	83.3	17	13
コーングルテンフィード		—	20	18	90.0	820	280
DDGS		—	6	3	50.0	500	320
コーングルテンミール		—	25	22	88.0	6,400	1,300
大豆油かす		—	41	33	80.5	130	21
コーンジャムミール		—	1	1	100.0	530	530
コーンコブミール		—	1	1	100.0	310	310
上記以外の飼料原料21種類	—	33	15	45.5	350		
計	—	469	399	85.1	6,400	150	
アフラトキシンB ₂	(検出下限 0.2 ppb)	—	528	40	7.6	9	1.6
アフラトキシンG ₁	(検出下限 0.2 ppb)	—	528	15	2.8	14	2.6
アフラトキシンG ₂	(検出下限 0.2 ppb)	—	528	3	0.6	1	0.7
ステリグマトシスチン	(検出下限 0.3 ppb)	—	457	192	42.0	280	2.8
T-2トキシシン	(検出下限 2 ppb)	—	458	215	46.9	210	9
ネオソラニオール	(検出下限 2 ppb)	—	457	42	9.2	19	6
フザレノン-X	(検出下限 20 ppb)	—	457	2	0.4	59	41
ニバレノール	(検出下限 20 ppb)	—	483	29	6.0	240	72
フモニシンB ₁	(検出下限 0.6 ppb)	—	64	55	85.9	2,600	670
フモニシンB ₂	(検出下限 0.6 ppb)	—	64	53	82.8	920	220
フモニシンB ₃	(検出下限 0.6 ppb)	—	58	52	89.7	470	100
オクラトキシンA	(検出下限 2 ppb)	—	71	3	4.2	17	8
シトリニン	(検出下限 7 ppb)	—	12				
エルゴバリン	(検出下限 10 ppb)	—	1	1	100.0	20	20
ロリトレムB	(検出下限 10 ppb)	—	1	1	100.0	36	36

2) 重金属

有害物質の指導基準のあるカドミウム、鉛、水銀及びひ素について配合飼料 157 点、魚粉 32 点、チキンミール等（豚肉骨粉、原料混合肉骨粉、チキンミール）18 点、稲わら 4 点のモニタリングを実施し、その結果を表 3 に示した。

各重金属のモニタリング結果は、以下のとおりであった。

i カドミウム

配合飼料 153 点中 111 点（検出率 72.5 %）から検出されたが、基準値を超えるものはなく最大値は成鶏飼育用で 0.30 ppm であった。

原料については、魚粉は 32 点中 32 点（検出率 100 %、最大値 2.2 ppm）、チキンミール等は 18 点中 5 点（検出率 27.8 %、最大値 0.26 ppm）、稲わらは 3 点中 1 点（検出率 33.3 %、0.04 ppm）からそれぞれ検出されたが、基準値を超えるものはなかった。

ii 鉛

配合飼料 153 点中 49 点（検出率 32.0 %）から検出されたが、基準値を超えるものはなく最大値は成鶏飼育用で 1.0 ppm であった。

原料については、魚粉 32 点中 20 点（検出率 62.5 %、最大値 1.5 ppm）、チキンミール等 18 点中 7 点（検出率 38.8 %、最大値 0.6 ppm）、稲わら 3 点中 3 点（検出率 100 %、最大値 1.0 ppm）からそれぞれ検出されたが、基準値を超えるものはなかった。

iii 水銀

配合飼料 149 点中 24 点（検出率 16.1 %）から検出されたが、基準値を超えるものはなく最大値は成鶏飼育用で 0.21 ppm であった。

原料については、魚粉は 30 点中 30 点（検出率 100 %、最大値 0.92 ppm）、チキンミール等は 18 点中 10 点（検出率 55.6 %、最大値 0.25 ppm）からそれぞれ検出されたが、基準値を超えるものはなかった。なお、稲わらは 2 点実施し検出されなかった。

iv ひ素

配合飼料 15 点中 11 点（検出率 73.3 %、最大値 0.26 ppm）から、稲わらは実施した 4 点全てから検出（最大値 4.6 ppm）されたが、基準値を超えるものはなかった。

表 3 重金属のモニタリング結果

モニタリング項目	指導基準値 (ppm)	モニタリングを行った飼料の種類	モニタリング点数	うち検出されたもの			検出下限 (ppm)	
				点数	検出率 (%)	最大値 (ppm)		平均値 (ppm)
カドミウム	1	配合飼料	153	111	72.5	0.30	0.09	
		乾牧草等	3	1	33.3	0.04	0.04	
		小計	156	112	71.8	0.30	0.09	
	3	魚粉	32	32	100.0	2.2	0.94	0.03
		チキンミール	10	1	10.0	0.04	0.04	
		原料混合肉骨粉	6	3	50.0	0.26	0.14	
		豚肉骨粉	2	1	50.0	0.03	0.03	
		小計	50	37	74.0	2.2	0.83	
	カドミウム 計	206	149	72.3	2.2	0.27		
	鉛	3.0	配合飼料	153	49	32.0	1.0	0.4
乾牧草等			3	3	100.0	1.0	0.8	
小計			156	52	33.3	1.0	0.4	
7.5		魚粉	32	20	62.5	1.5	0.6	0.2
		チキンミール	10	4	40.0	0.3	0.2	
		原料混合肉骨粉	6	2	33.3	0.6	0.5	
		豚肉骨粉	2	1	50.0	0.6	0.6	
		小計	50	27	54.0	1.5	0.6	
鉛 計		206	79	38.3	1.5	0.5		
水銀		0.4	配合飼料	149	24	16.1	0.21	0.04
	乾牧草等		2	2	100.0	0.21	0.04	
	小計		151	24	15.9	0.21	0.04	
	1	魚粉	30	30	100.0	0.92	0.34	0.02
		チキンミール	10	6	60.0	0.25	0.12	
		原料混合肉骨粉	6	4	66.7	0.17	0.12	
		豚肉骨粉	2	2	100.0	0.17	0.12	
		小計	48	40	83.3	0.92	0.28	
	水 銀 計	199	64	32.2	0.92	0.19		
	ひ素	2	配合飼料	15	11	73.3	0.26	0.13
7		稲わら	4	4	100.0	4.6	3.1	
ひ 素 計		19	15	78.9	4.6	0.92	0.05	

3) 農薬

農薬の汚染の可能性のある飼料等 675 点に対し、成分規格等省令で基準値の設定されている 38 成分及びその他の農薬 101 成分の計 139 成分について、63,262 点のモニタリングを実施した。その結果を表 4 及び表 5 に示した。

農薬が基準値を超過して検出された飼料が 6 点あり、その内訳は古畳わら 5 点及びアルファルファ 1 点であった。

古畳わら 5 点は、全て同一事業場で製造されたものであり、FAMIC の飼料立入検査において収去した試料 1 点から有機塩素系農薬 4 成分が基準値を超えて検出され、成分規格等省令の飼料一般の成分規格に不適合となったため、その原因究明のためにさらに出荷先で保管してあった 4 点についてモニタリングを行い、同様に検出されたものである。これら 5 点の古畳わらから基準値を超えて検出された農薬 4 成分は、BHC（検出値 0.008~0.47 ppm（4 点が基準値超過））、DDT（検出値 0.049~1.6 ppm（4 点が基準値超過））、アル

ドリン及びディルドリン（検出値 0.004~0.92 ppm（2 点が基準値超過））並びにエンドリン（検出値 0.002~0.038 ppm（1 点が基準値超過））であった。さらに当該古畳わらから基準値を超えていないものの検出された農薬は、リンデンが 5 点全てから検出（0.005~0.16 ppm）された他、基準値のない農薬でもクロルデン 1 点（検出値 0.009 ppm）及びヘキサクロロベンゼン 1 点（検出値 0.005 ppm）が検出された。

当該古畳わらは、一部が既に家畜に給与されていたため、当該家畜に由来する畜産物については、流通に先立ち食品衛生法上の基準を満たしていることの確認が行われ、農薬が検出された検査部位は廃棄する対応がなされた。

また、当該違反を受けて、農林水産省から「不適切な製造方法による古畳再生稲わらの製造等の禁止について」（平成 22 年 11 月 12 日付け 22 消安第 6549 号。農林水産省消費・安全局長通知）が発出され、塩素系農薬が混入するおそれのある「不適切な製造方法」による古畳再生稲わらは、飼料安全法第 23 条第 1 号に規定する「有害な物質を含み、又はその疑いがある」飼料に該当するものとして、その製造等を同条に基づく禁止の対象として取り扱うこととされた。さらに、「不適切な製造方法」による古畳再生稲わらの製造を行わないようにするための要件が示されるとともに、要件を満たしていることの確認は飼料安全法第 57 条の規定に基づく FAMIC の立入検査等により行うことが規定された。

次に、米国産アルファルファ 1 点から、ペンディメタリンが基準値を超えて 0.44 ppm 検出された。この原因としては、当該飼料の生産農場では、日本の省令基準を考慮せず、米国の使用基準に基づき農薬が散布されたため、日本の基準値を超過する量のペンディメタリンが当該飼料中に残留したものであった。なお、当該飼料は全量出荷前で市場には出回っていなかった。

その他、基準値を超過しなかったものの検出された主な農薬のモニタリング結果は、以下のとおりであった。

i マラチオン

基準値のある原料について、穀類 5 種類 35 点及び乾草 38 点のモニタリングを実施したが、いずれも不検出であった。

また、基準値のない飼料についても 445 点のモニタリングを実施したところ 20 点から検出された。その内訳は、ふすま 14 点（27 点中。検出率 51.9 %，最大値 0.17 ppm），ふすま（小麦）を主原料とする牛用配合飼料 6 点（112 点中。検出率 5.4 %，最大値 0.22 ppm）であり、ふすま（小麦）の汚染が確認された。

ii クロルピリホスメチル

基準値のある原料について、穀類 5 種類 35 点のモニタリングを実施したが、いずれも不検出であった。

また、基準値のない飼料についても 483 点のモニタリングを実施したところ 26 点から検出された。その内訳は、原料ではふすまから 7 点（27 点中。検出率 25.9 %，最大値 2.2 ppm），大豆油かすから 2 点（57 点中。検出率 3.5 %，最大値 0.098 ppm）検出された。配混合飼料は 272 点中 17 点（検出率 6.3 %）から検出され、最大値は肉用牛肥育用で 0.23 ppm であった。

iii ピリミホスメチル

基準値のある原料について、穀類 5 種類 35 点のモニタリングを実施したところ、ライ麦

から 1 点 55 ppb 検出されたが、基準値よりかなり低い数値であった。

また、基準値のない飼料についても 483 点のモニタリングを実施したところ 38 点から検出されたが、ビールかすから 1 点（1 点中、検出率 100 %）0.062 ppm 検出された以外の残り 37 点は全て配混合飼料（272 点中、検出率 13.6 %）から検出され、最大値は成鶏飼育用で 0.23 ppm であった。

iv その他検出されている農薬

① 配混合飼料

EPN, アセフェート, クロルピリホス, シハロトリン, ビフェントリン, ピリプロキシフェン, フェニトロチオン, ペルメトリン

② 原料

アトラジン（スーダングラス）, エジフェンホス（キャッサバ, コーングルテンミール, 大豆油かす）, ジメトエート（アルファルファ）, トリフルラリン（アルファルファ）, ビフェントリン（スーダングラス）, フェニトロチオン（ふすま）, フルシトリネート（大豆油かす）, フルトラニル（脱脂ぬか）, プロピコナゾール（フェスク）

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

表4 農薬のモニタリング結果（省令基準値のある成分）

モニタリング成分	モニタリングを行った 試料の種類	省令 基準値 (ppb)	モニタ リング 点数	うち検出されたもの			検出 下限 (ppb)	
				点数	検出率 (%)	最大値 (ppb)		平均値 (ppb)
BHC	配混合飼料	5	252	0				
	乾草	2×10	43	5	11.6	470	172	
	基準値のない飼料	—	220	0			5 (*)	
	計	—	515	5	1.0	470	172	
DDT	配混合飼料	1×10 ²	252	0				
	乾草	1×10 ²	43	5	11.6	1,600	452	
	基準値のない飼料	—	220	0			20 (*)	
	計	—	515	5	1.0	1,600	452	
アセフェート	基準値のない飼料	—	13	1	7.7	55	55	7
アトラジン	とうもろこし	2×10 ²	29	0				
	マイロ	2×10	1	0				
	えん麦	2×10	1	0				
	大麦	2×10	1	0				
	ライ麦	2×10	2	0				
	乾草	15×10 ³	38	2	5.3	52	27	
	基準値のない飼料	—	416	0				
	計	—	488	2	0.4	52	27	
アラクロール	とうもろこし	2×10 ²	29	0				
	マイロ	1×10 ²	1	0				
	えん麦	1×10 ²	1	0				
	大麦	5×10	1	0				
	ライ麦	5×10	2	0				
	乾草	3×10 ³	43	0				
	基準値のない飼料	—	421	0				
	計	—	498	0				
アルドリン 及び ディルドリン	配混合飼料	2×10	252	0				
	乾草	2×10	43	5	11.6	920	210	
	基準値のない飼料	—	220	0			20 (*)	
	計	—	515	5	1.0	920	210	
イソフェンホス	とうもろこし	2×10	29	0				
	基準値のない飼料	—	494	0			20	
	計	—	523	0				
イミダクロプリド	とうもろこし	1×10 ²	1	0			2	
エチオン	乾草	20×10 ³	38	0				
	基準値のない飼料	—	502	0				
	計	—	540	0			20	
エンドリン	配混合飼料	1×10	252	0				
	乾草	1×10	43	5	11.6	38	11	
	基準値のない飼料	—	220	0			20 (*)	
	計	—	515	5	1.0	38	11	
クロルピリホス	とうもろこし	1×10 ²	29	0				
	マイロ	75×10	1	0				
	えん麦	75×10	1	0				
	大麦	2×10 ²	2	0				
	ライ麦	1×10	2	0				
	乾草	13×10 ³	38	0				
	基準値のない飼料	—	445	3	0.7	140	84	
	計	—	518	3	0.6	140	84	
クロルピリホスメチル	とうもろこし	7×10 ³	29	0				
	マイロ	10×10 ³	1	0				
	えん麦	10×10 ³	1	0				
	大麦	6×10 ³	2	0				
	ライ麦	7×10 ³	2	0				
	基準値のない飼料	—	483	26	5.4	2,200	139	
計	—	518	26	5.0	2,200	139		
クロルフェンビンホス	とうもろこし	5×10	29	0				
	基準値のない飼料	—	501	0				
	計	—	530	0			20	

* 古畳わら5点を分析した際の検出下限は0.7 ppb

** 古畳わら5点を分析した際の検出下限は3 ppb

表 4 農薬のモニタリング結果（省令基準値のある成分，続き）

モニタリング成分	モニタリングを行った 試料の種類	省令 基準値 (ppb)	モニタ リング 点数	うち検出されたもの				検出 下限 (ppb)
				点数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)	
クロルプロファム	とうもろこし	5×10	29	0				20
	大麦	5×10	1	0				
	ライ麦	5×10	2	0				
	基準値のない飼料	—	456	0				
	計	—	488	0				
クロルベンジレート	とうもろこし	2×10	29	0				20
	基準値のない飼料	—	486	0				
	計	—	515	0				
ジクロルボス	基準値のない飼料	—	13	0				7
シハロトリン	とうもろこし	4×10	29	0				20
	マイロ	2×10 ²	1	0				
	えん麦	2×10 ²	1	0				
	大麦	2×10 ²	1	0				
	ライ麦	2×10	2	0				
	乾草	6×10 ²	38	0				
	基準値のない飼料	—	416	2	0.5	58	44	
	計	—	488	2	0.4	58	44	
ジメトエート	とうもろこし	1×10 ³	29	0				20
	マイロ	2×10 ²	1	0				
	えん麦	2×10 ²	1	0				
	大麦	4×10	1	0				
	ライ麦	2×10 ²	2	0				
	乾草	2×10 ³	38	1	2.6	96	96	
	基準値のない飼料	—	429	0				
	計	—	501	1	0.2	96	96	
ダイアジノン	とうもろこし	2×10	29	0				20
	マイロ	1×10 ²	1	0				
	えん麦	1×10 ²	1	0				
	大麦	1×10 ²	2	0				
	ライ麦	1×10 ²	2	0				
	乾草	10×10 ³	38	0				
	基準値のない飼料	—	445	0				
	計	—	518	0				
デルタメトリン 及び トラロメトリン	とうもろこし	1×10 ³	29	0				30
	マイロ	1×10 ³	1	0				30
	えん麦	1×10 ³	1	0				30
	大麦	1×10 ³	1	0				30
	ライ麦	1×10 ³	2	0				30
	乾草	5×10 ³	38	0				45
	基準値のない飼料	—	416	0				30
	計	—	488	0				
テルブホス	とうもろこし	1×10	29	0				5
	マイロ	5×10	1	0				
	えん麦	5×10	1	0				
	大麦	1×10	2	0				
	ライ麦	5	2	0				
	乾草	1×10 ³	38	0				
	基準値のない飼料	—	445	0				
	計	—	518	0				
トリシクラゾール	とうもろこし	2×10	7	0				1
	乾草	5×10 ³	1	0				120
	計	—	8	0				

表4 農薬のモニタリング結果（省令基準値のある成分，続き）

モニタリング成分	モニタリングを行った試料の種類	省令基準値 (ppb)	モニタリング点数	うち検出されたもの				検出下限 (ppb)
				点数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)	
パラチオン	とうもろこし	3×10 ²	29	0				20
	マイロ	8×10	1	0				
	えん麦	8×10	1	0				
	大麦	5×10 ²	2	0				
	ライ麦	5×10	2	0				
	乾草	5×10 ³	38	0				
	基準値のない飼料	—	445	0				
	計	—	518	0				
ピリミホスメチル	とうもろこし	1×10 ³	29	0				20
	マイロ	1×10 ³	1	0				
	えん麦	1×10 ³	1	0				
	大麦	1×10 ³	2	0				
	ライ麦	1×10 ³	2	1	50.0	55	55	
	基準値のない飼料	—	483	38	7.9	230	65	
	計	—	518	39	7.5	230	65	
	フィプロニル	配混合飼料（鶏・うずら用）	1×10	87	0			
配混合飼料（豚・牛等用）		2×10	165	0				
乾草		2×10 ²	38	0				
基準値のない飼料		—	220	0				
計		—	510	0				
フェントロチオン	とうもろこし	1×10 ³	29	0				20
	マイロ	1×10 ³	1	0				
	えん麦	1×10 ³	1	0				
	大麦	5×10 ³	2	0				
	小麦	10×10 ³	1	0				
	ライ麦	1×10 ³	2	0				
	乾草	10×10 ³	38	0				
	基準値のない飼料	—	444	6	1.4	420	93	
	計	—	518	6	1.2	420	93	
フェンチオン	とうもろこし	5×10 ³	29	0				20
	基準値のない飼料	—	511	0				
	計	—	540	0				
フェントエート	とうもろこし	4×10 ²	29	0				20
	マイロ	4×10 ²	1	0				
	えん麦	4×10 ²	1	0				
	大麦	4×10 ²	2	0				
	ライ麦	4×10 ²	2	0				
	基準値のない飼料	—	483	0				
	計	—	518	0				
フェンバレレート	配混合飼料（鶏・うずら用）	5×10 ²	87	0				20
	配混合飼料（豚用）	4×10 ³	63	0				
	配混合飼料（牛等用）	8×10 ³	102	0				
	乾草	13×10 ³	38	0				
	基準値のない飼料	—	220	0				
	計	—	510	0				
フェンプロパトリン	乾草	20×10 ³	38	0				20
	基準値のない飼料	—	472	0				
	計	—	510	0				
ヘプタクロル	配混合飼料	2×10	252	0				20 (*)
	乾草	2×10	43	0				
	基準値のない飼料	—	220	0				
	計	—	515	0				

* 古畳わら5点を分析した際の検出下限は0.7 ppb

表4 農薬のモニタリング結果（省令基準値のある成分，続き）

モニタリング成分	モニタリングを行った 試料の種類	省令 基準値 (ppb)	モニタ リング 点数	うち検出されたもの				検出 下限 (ppb)
				点数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)	
ペルメトリン	とうもろこし	2×10 ³	29	0				20
	マイロ	2×10 ³	1	0				
	えん麦	2×10 ³	1	0				
	大麦	2×10 ³	1	0				
	ライ麦	2×10 ³	2	0				
	乾草	55×10 ³	38	0				
	基準値のない飼料	—	416	1	0.2	100	100	
	計	—	488	1	0.2	100	100	
ペンディメタリン	とうもろこし	2×10 ²	29	0				20
	マイロ	1×10 ²	1	0				
	えん麦	1×10 ²	1	0				
	大麦	2×10 ²	1	0				
	ライ麦	2×10 ²	2	0				
	乾草	1×10 ²	38	1	2.6	440	440	
	基準値のない飼料	—	416	0				
	計	—	488	1	0.2	440	440	
ホスメット	とうもろこし	5×10	29	0				20
	マイロ	5×10	1	0				
	えん麦	5×10	1	0				
	大麦	5×10	2	0				
	ライ麦	5×10	2	0				
	乾草	40×10 ³	38	0				
	基準値のない飼料	—	445	0				
	計	—	518	0				
ホレート	とうもろこし	5×10	29	0				20
	マイロ	5×10	1	0				
	えん麦	5×10	1	0				
	大麦	5×10	2	0				
	ライ麦	5×10	2	0				
	乾草	1.5×10 ³	38	0				
	基準値のない飼料	—	445	0				
	計	—	518	0				
マラチオン	とうもろこし	2×10 ³	29	0				20
	マイロ	2×10 ³	1	0				
	えん麦	2×10 ³	1	0				
	大麦	2×10 ³	2	0				
	ライ麦	2×10 ³	2	0				
	乾草	135×10 ³	38	0				
	基準値のない飼料	—	445	20	4.5	220	79	
	計	—	518	20	3.9	220	79	
メチダチオン	とうもろこし	1×10 ²	29	0				20
	マイロ	2×10 ²	1	0				
	えん麦	2×10 ²	1	0				
	大麦	2×10	2	0				
	ライ麦	2×10	2	0				
	乾草	12×10 ³	38	0				
	基準値のない飼料	—	445	0				
	計	—	518	0				
リンデン (γ-BHC)	配混合飼料（鶏・うずら，豚用）	5×10	150	0				5 (*)
	配混合飼料（牛等用）	4×10 ²	102	0				
	乾草	4×10 ²	43	5	11.6	160	47	
	基準値のない飼料	—	220	0				
	計	—	515	5	1.0	160	47	

* 古畳わら5点を分析した際の検出下限は0.7 ppb

表5 農薬のモニタリング結果 (基準値のない成分)

モニタリング成分	うち検出されたもの				うち検出されなかったもの				
	モニタリング点数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)	モニタリング点数	検出率 (%)	最大値 (ppb)	平均値 (ppb)	
EPN	540	3	0.6	41	35	510	0	0	20
アセトクロール	510	0		20		510	0		20
アニホス	510	0		20		510	0		20
アメトリン	510	0		20		510	0		20
アリドクロール	510	0		20		510	0		20
アレスリン	510	0		20		510	0		20
イサゾホス	510	0		20		510	0		20
イソプロチオラン	510	0		20		510	0		20
イプロベンホス	540	0		20		510	0		20
エジフェンホス	540	3	0.6	50	43	510	0		20
エトフルラリン	510	0		20		510	0		20
エトフェンプロックス	510	0		20		510	0		20
エトフメセート	510	0		20		510	1	0.2	36
エトプロホス	540	0		20		510	0		20
エトリジアゾール	510	0		20		510	0		20
エトリムホス	540	0		20		30	0		7
エンドスルフアen	5	0		0.7		510	0		20
オキサジアゾン	510	0		20		540	0		20
カズサホス	510	0		20		510	0		20
カルフェントランエチル	510	0		20		510	2	0.4	120
カルボフェノチオン	30	0		7		510	0		20
キナルホス	30	0		7		510	0		20
キントゼン	510	0		20		510	0		20
クレソキシムメチル	510	0		20		510	0		20
クロタルジメチル	510	0		20		510	2	0.4	250
クロルデン	5	1	20.0	9	9	540	0		20
クロルフェナピル	510	0		20		510	0		20
ジクロホップメチル	510	0		20		510	0		20
ジクロラン	515	0		20		13	0		7
ジフェナミド	510	0		20		510	0		20
ジフェノコナゾール	510	0		20		5	0		3
ジメテナミド	510	0		20		510	0		20
ジメピペレート	510	0		20		510	0		20
シラフルオフェン	510	0		20		510	1	0.2	48
ターバシシル	510	0		20		510	0		20
チオベンカルブ	510	0		20		510	0		20
テクナゼン	510	0		20		510	0		20
テトラクロルピホス	510	0		20		510	0		20
テトラコナゾール	510	0		20		510	0		20
テトラジホス	510	0		20		510	0		20
テブコナゾール	510	0		20		510	0		20
テブフェンピラド	510	0		20		510	0		20
テフルトリン	510	0		20		510	0		20
テルブトリン	510	0		20		510	0		20
トリアジメホス	510	0		20		510	0		20
トリアレート	510	0		20		510	0		20
トリフルラリン	510	1	0.2	36	36	510	1	0.2	1,800
トリフロキシストロピン	510	0		20		510	0		20
トリフルアニド	510	0		20		510	0		20
トルクロホスメチル	30	0		7		510	0		20
ナプロバミド	510	0		20		510	0		20
パラチオンメチル	540	0		20		510	0		20
ハルフェンプロックス	510	0		20		510	0		20
ピフェントリン	510	2	0.4	120	72	510	0		20
ピペロホス	510	0		20		510	0		20
ピリダフェンチオン	510	0		20		510	0		20
ピリダベン	510	0		20		510	0		20
ピリプロキシフェン	510	2	0.4	250	136	510	0		20
ピンクロゾリン	510	0		20		540	0		20
フェナリモル	510	0		20		510	0		20
フェノチオカルブ	510	0		20		30	0		7
フェノトリン	510	0		20		510	0		20
フェンシルホチオン	13	0		7		515	0		20
フェンコナゾール	510	0		20		510	0		20
ブタクロール	5	0		3		515	0		20
ブタミホス	510	0		20		510	0		20
フラムプロップメチル	510	0		20		510	0		20
フルシトリネート	510	1	0.2	48	48	510	0		7

4) その他の有害物質

i 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

乾牧草についてアルファルファ 8 点，スーダングラス 9 点，クレイングラス 1 点の計 18 点モニタリングを実施した。硝酸態窒素は，アルファルファは全 8 点から，スーダングラスは 7 点から，クレイングラスは 1 点から検出された。最大値は，アルファルファが 860 ppm，スーダングラスが 1,000 ppm，クレイングラスが 59 ppm であった。亜硝酸態窒素はアルファルファ 2 点から検出された。

特に問題となる高濃度汚染の牧草はなかったが，検出率が高く今後とも留意が必要である。

ii ヒスタミン

魚粉 16 点についてモニタリングを実施した結果，15 点から検出（検出率 93.8 %）された。

特に問題となる高濃度の汚染はなかったが，検出率が高く今後とも留意が必要である。

iii マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン

魚粉 27 点についてモニタリングを実施した結果，いずれも検出されなかった。

表 6 その他の有害物質のモニタリング結果

モニタリング成分	モニタリングを行った試料の種類	モニタリング点数	うち検出されたもの			検出下限 ¹⁾	
			点数	検出率 (%)	最大値 ¹⁾		平均値 ¹⁾
硝酸態窒素	アルファルファ	8	8	100.0	860	10	
	スーダングラス	9	7	77.8	1,000		
	クレイングラス	1	1	100.0	59		
	計	18	16	88.9	1,000		
亜硝酸態窒素	アルファルファ	8	2	25.0	77	10	
	スーダングラス	9	0				
	クレイングラス	1	0				
	計	18	2	11.1	77		
ヒスタミン	魚粉	16	15	93.8	2,100	380	3
マラカイトグリーン	魚粉	27	0				2
ロイコマラカイトグリーン	魚粉	27	0				2

- 1) 単位：硝酸態窒素，亜硝酸態窒素及びヒスタミンはppm，マラカイトグリーン，ロイコマラカイトグリーンはppbで示した。

3.2 牛用配混合飼料等への動物由来たん白質の混入確認試験

国内で製造した魚粉 88 検体，イカミール等 2 検体について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，魚粉 1 検体が ELISA 試験で牛由来たん白質陽性反応を示したが，判定の基準に従い総合判定では牛由来たん白質不検出と判定された。（表 7 参照）

チキンミール 28 検体，フェザーミール 16 検体及び豚血粉 3 検体について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，フェザーミール 1 検体が PCR 試験で反すう動物由来 DNA が検出された。この反すう動物由来 DNA が牛由来であるか確認するため PCR を実施した結果，牛由来 DNA は検出されなかった。判定の基準に従い総合判定では，反すう動物由来たん白質不検出と判定した。（表 8 参照）

ポークミール 2 検体及び原料混合肉骨粉 32 検体について，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，原料混合肉骨粉 1 検体で，ELISA 試験による反すう動物由来たん白質陽性及び反すう動物由来 DNA が検出され，判定の基準に従い総合判定で反すう動物由来たん白質が検出されたものが 1 検体あった。（表 8 参照）

原料混合肉骨粉に牛由来原料が混入した原因については，特定するには至らなかったが，①原料収集缶を原料の畜種ごとに専用化されておらず，使用後の洗浄不十分による汚染，②原料搬送用フォークリフトの共用による汚染，③原料輸送時に牛原料と豚原料を混載しており，荷こぼれによる汚染，④原料荷下ろし場所の不分離による原料の取り違えが，今回の原因となった可能性が高いと考えられた。当該工場では，これらの対策のため①牛工場エリアと豚工場エリアの区分の明確化，②原料収集缶の専用化，などの対策を講じると共に作業手順書及び基準書を整備し，各現場における作業内容の確認を行うこととした。

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

	顕微鏡鑑定			ELISA試験						PCR試験						総合判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			鶏由来たん白質			ほ乳動物由来DNA			鶏由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
魚粉	88	0	0.0	88	1	1.1	1	0	0.0	88	0	0.0	1	0	0.0	0
フィッシュソリュブル	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0				0
イカミール	1	0	0.0	1	0	0.0				1	0	0.0				0

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

	顕微鏡鑑定			ELISA試験						PCR試験						総合判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			反すう動物由来たん白質			反すう動物由来DNA			牛由来DNA						
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)				
チキンミール	28	0	0.0	28	0	0.0	28	0	0.0							0
フェザーミール	16	0	0.0	16	0	0.0	16	1	6.3	1	0	0.0				0
原料混合肉骨粉				32	1	3.1	32	1	3.1							1
豚肉骨粉				2	0	0.0	2	0	0.0							0
豚血粉	3	0	0.0	3	0	0.0	3	0	0.0							0

国内で製造したほ乳期子牛用配合飼料 14 検体，若令牛用配合飼料 14 検体，幼令肉牛用配合飼料 6 検体，乳牛用配合飼料 53 検体，肉牛用配合飼料 68 検体，種牛等用配合飼料 42 検体，牛用混合飼料 30 検体及び糖蜜吸着飼料 1 検体について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，幼令肉牛用配合飼料 1 検体，肉牛用配合飼料 1 検体及び肉牛繁殖用配合飼料 1 検体が ELISA 試験で牛由来たん白質陽性反応を示した．判定の基準に従い総合判定では牛由来たん白質は不検出と判定した．（表 9 参照）

一連の工程で製造するため農林水産大臣の確認が必要な動物由来たん白質を使用した混合飼料 7 検体及び発酵飼料等 5 検体について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，混合飼料 1 検体で牛由来たん白質，ほ乳動物由来 DNA 及び牛由来 DNA が検出された．顕微鏡鑑定で不検出であったため，当該工場の工程での他の動物性たん白質の混入の可能性を調査した上で，判定の基準に従い総合判定で反すう動物由来たん白質不検出と判定した．（表 9 参照）

輸入の牛用混合飼料 32 検体について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，全ての検体で不検出であり，総合判定で反すう動物由来たん白質は不検出と判定した．（表 10 参照）

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

	顕微鏡鑑定			ELISA試験									PCR試験									総合判定 検出 点数				
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			反すう動物由来たん白質			鶏由来たん白質			ほ乳動物由来DNA			反すう動物由来DNA			牛由来DNA				鶏由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)		試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
牛用飼料等																										
ほ乳期子牛用配合飼料	14	0	0.0	4	0	0.0							4	0	0.0											0
若令牛用配合飼料	14	0	0.0	12	0	0.0							12	0	0.0											0
幼令肉牛用配合飼料	6	0	0.0	5	1	20.0							5	0	0.0											0
乳牛用配合飼料	53	0	0.0	46	0	0.0							46	0	0.0											0
肉牛用配合飼料	68	0	0.0	57	1	1.8							57	0	0.0											0
乳肉牛用配合飼料	1	0	0.0	1	0	0.0							1	0	0.0											0
肉牛繁殖用配合飼料	8	0	0.0	8	1	12.5							8	0	0.0											0
種牛等用配合飼料	4	0	0.0	4	0	0.0							4	0	0.0											0
牛複数ステージ配合飼料	29	0	0.0	20	0	0.0							20	0	0.0											0
混合飼料	30	0	0.0	29	0	0.0							29	0	0.0											0
糖蜜吸着飼料	1	0	0.0	1	0	0.0							1	0	0.0											0
その他の畜種向け飼料 (動物質原料を含むもの)																										
混合飼料等	7	0	0.0	6	1	16.7	2	0	0.0				6	1	16.7	1	0	0.0	1	1	100.0					0
発酵飼料等	5	0	0.0	5	0	0.0				2	0	0.0	5	0	0.0								2	0	0.0	0

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

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出点数
	獣骨, 獣毛			反すう動物由来たん白質			反すう動物由来DNA			
	試験点数	検出点数	検出率 (%)	試験点数	検出点数	検出率 (%)	試験点数	検出点数	検出率 (%)	
牛用混合飼料										
アメリカ	15	0	0.0	15	0	0.0	15	0	0.0	0
イタリア	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	0
オーストラリア	2	0	0.0	2	0	0.0	2	0	0.0	0
カナダ	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	0
韓国	2	0	0.0	2	0	0.0	2	0	0.0	0
台湾	3	0	0.0	3	0	0.0	3	0	0.0	0
中国	4	0	0.0	4	0	0.0	4	0	0.0	0
デンマーク	1	0	0.0	1	0	0.0	1	0	0.0	0
フランス	3	0	0.0	3	0	0.0	3	0	0.0	0

3.3 不溶性不純物

飼料用として出荷、流通している及び動物性油脂（確認済動物性油脂、回収食用油、混合油脂等）60 検体及び特定動物性油脂 2 検体について、不溶性不純物含有量の試験を実施し、その結果を表 11 に示した。

不溶性不純物含有量が成分規格等省令の動物性油脂の成分規格を超えたものはなかった。

表 11 不溶性不純物のモニタリング結果

モニタリングを行った試料の種類	成分規格 (不溶性不純物の含有量 (%以下))	モニタリング点数	最大値 (%)	平均値 (%)
動物性油脂	0.15	60	0.093	0.020
特定動物性油脂	0.02	2	0.015	0.012

3.4 サルモネラ

飼料原料は、163 検体中 2 検体が陽性で、その陽性率は 1.2 %であった。陽性率は、前年度の 2.3 %に比べて低い値であった。

飼料原料の区分別の陽性率は、植物性油かす類が 4.2 %（前々年度 7.1 %，前年度 0 %），動物質性飼料が 0.8 %（前々年度 3.4 %，前年度 2.7 %）であった。一方、そうこう類（前々年度 0 %，前年度 0 %）は、すべて陰性であった。（表 12 参照）

国内製造品の陽性率は 0.7 %であり、前年度の 2.4 %と比べると低い値であった。一方、輸入品の陽性率は 10.0 %であり、その内訳はインド産大豆油かす 1 検体であった。なお、前年度の陽性率は 0 %であったが、前々年度はインド産大豆油かす 1 検体が陽性であり、陽性率は 12.5 %であった。（表 13 参照）

配混合飼料は 161 検体中 3 検体が陽性で、成鶏飼育用配合飼料、種豚飼育用配合飼料及び肉豚

肥育用配合飼料でそれぞれ 1 検体が陽性であった。なお、前々年度及び前年度の陽性率はそれぞれ 1.5 %及び 1.4 %であった。（表 14 参照）

陽性検体から分離した血清型は 6 種類であった。

S.Bareilly は、前々年度にも飼料から分離されている。また、大豆油かすからは 3 種類のサルモネラが検出されたが、1 種類については血清型を特定することができなかった。（表 15 参照）

なお、国立感染症研究所感染症情報センターの病原微生物検出情報⁴⁾によれば、これら 6 血清型の内、*S.Bareilly* は、過去 5 年間に国内で発生したサルモネラ食中毒の原因菌として分離された主要血清型リストには掲載されており、注意が必要であると考えられた。

表 12 飼料原料の種類別検体数及び陽性率（サルモネラ）

飼料の種類	検体数	陽性検体数	陽性率 (%)
動物質性飼料			
魚粉	75	1	1.3
チキンミール	22	0	0
フェザーミール	12	0	0
原料混合肉骨粉	16	0	0
豚肉骨粉	2	0	0
イカミール	1	0	0
小 計	128	1	0.8
植物油かす			
大豆油かす	15	1	6.7
なたね油かす	7	0	0
ごま油かす	1	0	0
コーングルテンミール	1	0	0
小 計	24	1	4.2
そうこう類			
ふすま	5	0	0
米ぬか	4	0	0
ビールかす	1	0	0
コーングルテンフィード	1	0	0
小 計	11	0	0
合 計	163	2	1.2

表 13 原産国及び飼料原料の種類別陽性率（サルモネラ）

原産国	陽性検体数/検体数									合計 (陽性率)
	動物質性飼料			植物性油かす			そうこう類			
	魚粉	チキン ミール	その他	大豆 油かす	なたね 油かす	その他	ふすま	米ぬか	その他	
国産	1/68	0/22	0/31	0/12	0/7	0/2	0/5	0/4	0/2	1/153
(陽性率)	(1.5%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0.7%)
輸入										
アメリカ	0/1									0/1 (0%)
インド	0/1			1/1						1/2 (50%)
エクアドル	0/1									0/1 (0%)
中国				0/2						0/2 (0%)
ベトナム	0/1									0/1 (0%)
ペルー	0/3									0/3 (0%)
小計	0/7			1/3						1/10
(陽性率)	(0%)			(3.3%)						(10.0%)
合計	1/75	0/22	0/31	1/15	0/7	0/2	0/5	0/4	0/2	2/163
(陽性率)	(1.3%)	(0%)	(0%)	(16.7%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(1.2%)

表 14 配混合飼料の検体数及び陽性率（サルモネラ）

飼料の種類	検体数	陽性検体数	陽性率(%)
鶏用配合飼料	55	1	1.8
豚用配合飼料	40	2	5.0
牛用配合飼料	52	0	0
混合飼料	11	0	0
動物質性たん白質混合発酵飼料	2	0	0
糖蜜吸着飼料	1	0	0
合計	161	3	1.9

表 15 陽性検体の血清型（サルモネラ）

血清型	陽性検体数				合 計
	魚粉	大豆 油かす	鶏用配合 飼料	豚用配合 飼料	
S. Anatum			1		1
S. Bareilly		1			
S. Kentucky		1			1
S. Havana	1				1
S. Mbandaka				1	1
S. Muenster				1	1
不明		1			
合 計	1	3	1	2	7

文 献

- 1) （社）日本油化学会編：基準油脂分析試験法（I），1996年版(2)，2.1.1 試料採取方法（1996）.
- 2) 泉和夫，石橋隆幸，青山幸二，石黒瑛一：飼料研究報告，27，233-234（2002）.
- 3) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知：飼料中のデオキシニバレノールの平成 22 年度中の取扱いについて，平成 22 年 10 月 6 日，22 消安第 5364 号（2010）.
- 4) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，<http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html>.(2011.5 現在)

調査資料

2 飼料中のダイオキシン類のモニタリング結果について(平成 18~22 年度)

山本 謙吾^{*1}, 山多 利秋^{*2}, 小野 雄造^{*3}

Monitoring Results of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in Feeds (in the fiscal 2006~2010)

Kengo YAMAMOTO^{*1}, Toshiaki YAMATA^{*2} and Yuzo ONO^{*3}^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department,^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now Kobe Regional Center),^{*3} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now Fukuoka Regional Center))

The contamination of dioxins (polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and coplanar polychlorinated biphenyls (Co-PCBs)) in feedstuffs of animal by-product was investigated. From fiscal year 2006 to 2010, 54 fish meal samples, 41 fish oil samples, 54 animal fats and oils samples, and 9 meat-and-bone meal samples were collected from the Japanese feed production industry. These samples were digested with 2 mol/L potassium hydroxide ethanol solution, and dioxins were extracted with hexane. These extracts were purified with multi-layered silica gel column. The effluents were purified and separated into mono-*ortho* Co-PCBs fraction and PCDDs + PCDFs + non-*ortho* Co-PCBs fraction with active carbon-dispersed silica gel reversible column. Dioxins in each fraction were analyzed by a high resolution GC-MS, and then toxic equivalent quantities (TEQ) of PCDDs + PCDFs, Co-PCBs and the total value were calculated. The TEQ levels of dioxins in feedstuff samples were in the range of 0.0006 ~ 2.4 ng-TEQ/kg for fish meal, 0.82 ~ 22 ng-TEQ/kg for fish oil, 0.004 ~ 5.2 ng-TEQ/kg for animal fats and oils, 0.0006 ~ 0.06 ng-TEQ/kg for meat-and-bone meal, respectively. The congener profile in samples of fish meal, fish oil, animal fats and oils, meat-and-bone meal suggested that the total TEQ was derived mainly from Co-PCBs, which accounted for 80 ~ 93 % of the total TEQ value. Especially, the sum of non-*ortho* Co-PCBs represented 75 ~ 83% of the total TEQ.

Key words: dioxin ; polychlorinated dibenzo-*para*-dioxin (PCDD) ; polychlorinated dibenzofuran (PCDF) ; coplanar polychlorinated biphenyl (Co-PCB) ; feedstuff ; fish meal ; fish oil ; animal fats and oils ; meat-and-bone meal ; TEQ (2,3,7,8-TeCDD Toxicity Equivalent Quantity)

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 同神戸センター^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 同福岡センター

キーワード：ダイオキシン；ポリ塩化ジベンゾ - パラ - ジオキシン；ポリ塩化ジベンゾフラン；コプラナーポリ塩化ビフェニル；飼料原料；魚粉；魚油；動物性油脂；肉骨粉；毒性当量

1 緒 言

農林水産消費安全技術センターは、「ダイオキシン対策推進基本指針」（平成 11 年 3 月ダイオキシン対策関係閣僚会議決定）及び「食品の安全性に関する有害化学物質サーベイランス・モニタリング中期計画」（平成 18 年 4 月 20 日農林水産省公表。以下「中期計画」という。）に基づき、飼料中のダイオキシン類（ポリ塩化ジベンゾ - パラ - ジオキシン（以下「PCDDs」という。）、ポリ塩化ジベンゾフラン（以下「PCDFs」という。）及びコプラナーポリ塩化ビフェニル（以下「Co-PCBs」という。））のモニタリング調査を平成 12 年度から実施し、各飼料の毒性当量（TEQ）について順次報告してきた¹⁾。

今回、中期計画期間（平成 18~22 年度）のモニタリング結果について、飼料の種類別に取りまとめたので概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試 料

平成 18 年度は（旧）肥飼料検査所本部，札幌事務所，仙台事務所，名古屋事務所，大阪事務所及び福岡事務所において，平成 19~22 年度は農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，札幌センター，仙台センター，名古屋センター，神戸センター（（旧）神戸センター大阪事務所を含む），福岡センターにおいて飼料原料工場，配合飼料工場，港湾倉庫等から採取した魚粉（54 検体），魚油（41 検体），動物性油脂（54 検体）及び肉骨粉（9 検体）を供試試料とした。試料の採取方法は，飼料等検査実施要領²⁾に準拠した。

分析用試料の調製及び保管方法は，飼料分析基準³⁾第 2 章の規定に準拠した。

なお，魚油及び動物性油脂については 70 °C に加温して融解し，よく混合して採取したものを供試試料とした。

2.2 方 法

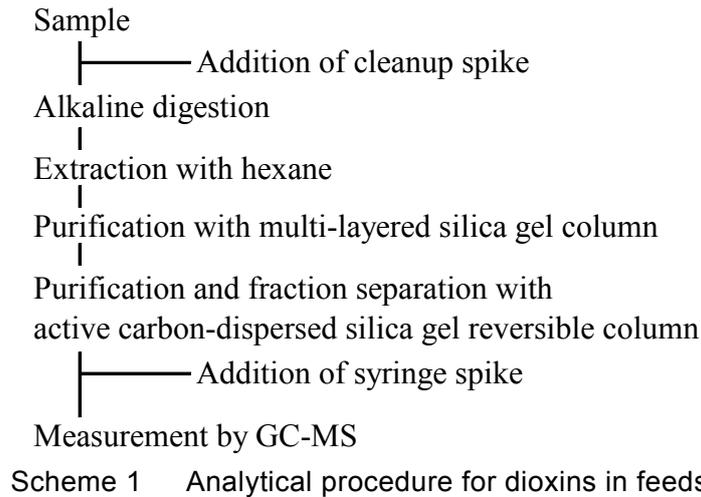
ダイオキシン類の測定方法並びに各異性体の定量及び毒性当量への換算は，飼料中のダイオキシン類の定量法暫定ガイドライン⁴⁾に準拠した。

また，分析法の概要を Scheme 1 に示した。

なお，定量下限値については Table 1 のとおりであり，飼料中の異性体の濃度が定量下限値未満の場合，その異性体の毒性当量を 0 として扱った。

Table 1 Target lower limit of quantification of dioxins in feeds

PCDDs and PCDFs			Co-PCBs	
Tetra- and pentachlorides	Hexa- and heptachlorides	Octachlorides	Non-ortho	Mono-ortho
0.05 ng/kg	0.1 ng/kg	0.2 ng/kg	0.5 ng/kg	1 ng/kg



3 結果

3.1 飼料の総毒性当量

平成 18~22 年度の飼料原料の種類別の毒性当量を Table 2 に示した。

魚粉 54 検体中のダイオキシン類の総毒性当量は、平均値が 0.68 ng-TEQ/kg (最小 0.0006~最大 2.4 ng-TEQ/kg) であった。

魚油 41 検体中のダイオキシン類の総毒性当量は、平均値が 10 ng-TEQ/kg (最小 0.82~最大 22 ng-TEQ/kg) であった。

動物性油脂 54 検体中のダイオキシン類の総毒性当量は、平均値が 0.27 ng-TEQ/kg (最小 0.004~最大 5.2 ng-TEQ/kg) であった。なお、最大値を示した 1 検体は、魚油を含有する混合油脂であり、これを除いた 53 検体中のダイオキシン類の総毒性当量は、平均値が 0.18 ng-TEQ/kg (最小 0.004~最大 0.62 ng-TEQ/kg) であった。

肉骨粉 9 検体中のダイオキシン類の総毒性当量は、平均値が 0.02 ng-TEQ/kg (最小 0.0006~最大 0.06 ng-TEQ/kg) であった。

当センターにおいて、平成 18~22 年度にモニタリング調査を行ったすべての飼料の総毒性当量は、EU が定めるダイオキシン類の最大基準値未満であった。参考として、EU におけるダイオキシン類の基準値を Table 3 に示した。

3.2 総毒性当量における PCDDs, PCDFs 及び Co-PCBs の占める割合

モニタリングした魚粉 (54 検体), 魚油 (41 検体), 動物性油脂 (54 検体) 及び肉骨粉 (9 検体) について、各総毒性当量における PCDDs, PCDFs 及び Co-PCBs の毒性当量の占める割合を算出した。

飼料の種類別に PCDDs, PCDFs 及び Co-PCBs の平均毒性当量を求め、これらの平均毒性当量が総平均毒性当量に占める割合を算出した。

その結果、Fig. 1 のとおり、魚粉、魚油、動物性油脂及び肉骨粉中の Co-PCBs の毒性当量は、各総毒性当量の 80~93 % と最も大きな割合を占め、更にそのうちノンオルト体の Co-PCBs の毒性当量の占める割合は総毒性当量の 75~83 % であった。

Table 2. Contaminations of dioxins in feedstuffs

Kind of feedstuffs	Year	N ¹⁾	TEQ value of PCDDs+PCDFs			TEQ value of Co-PCBs			Total TEQ value		
			Max. ²⁾	Min. ²⁾	Mean ²⁾	Max. ²⁾	Min. ²⁾	Mean ²⁾	Max. ²⁾	Min. ²⁾	Mean ²⁾
Fish meal	2006	14	0.43	0.004	0.17	2.0	0.04	0.85	2.4	0.06	1.0
	2007	10	0.42	0.004	0.11	1.2	0.05	0.52	1.6	0.06	0.63
	2008	10	0.41	0.009	0.13	1.1	0.07	0.52	1.5	0.08	0.65
	2009	10	0.09	0	0.04	0.72	0.0006	0.30	0.80	0.0006	0.33
	2010	10	0.10	0	0.04	1.1	0.13	0.56	1.2	0.13	0.60
	2006	6	3.2	0.03	1.7	15	0.79	8.9	18	0.82	11
	2007	10	4.5	0.73	2.3	17	6.2	10	22	6.9	12
	2008	10	5.9	0.54	2.2	15	5.0	9.5	19	5.5	12
	2009	10	1.5	0.06	0.67	11	0.81	7.8	12	0.87	8.3
	2010	5	1.1	0.08	0.60	8.8	0.79	5.5	9.8	0.87	6.1
Animal fats and oils	2006	12	0.14	0.003	0.05	0.52	0.05	0.21	0.62	0.08	0.26
	2007	12	0.18	0.007	0.07	0.41	0.0003	0.12	0.52	0.01	0.19
	2008	10 ³⁾	0.29	0.007	0.07	4.9	0.0004	0.60	5.2	0.008	0.67
	2009	10	0.07	0.001	0.03	0.15	0.06	0.10	0.20	0.07	0.12
Meat-and-bone meal, poultry by-product	2010	10	0.15	0.002	0.04	0.14	0.001	0.08	0.25	0.04	0.13
	2006	4	0.003	0.0001	0.001	0.06	0.0007	0.04	0.06	0.04	0.04
	2007	5	0.006	0.0002	0.001	0.004	0.0005	0.002	0.008	0.0006	0.004
1) Number of samples											
2) Max.; Maximum TEQ value, Min.; Minimum TEQ value, Mean; Mean TEQ value											
3) One sample was a mixed oil of animal- and fish-origin and highly contaminated by Co-PCBs. The alternative values calculated with another nine samples are shown below.											
Kind of feedstuffs	Year	N ¹⁾	TEQ value of PCDDs+PCDFs			TEQ value of Co-PCBs			Total TEQ value		
			Max. ²⁾	Min. ²⁾	Mean ²⁾	Max. ²⁾	Min. ²⁾	Mean ²⁾	Max. ²⁾	Min. ²⁾	Mean ²⁾
Animal fats and oils	2008	9	0.14	0.007	0.05	0.32	0.0004	0.12	0.33	0.008	0.17

Table 3 Maximum levels for dioxins and coplanar PCBs
in feedstuffs applied in the European Union

	Maximum limits *	
	PCDDs+PCDFs	PCDDs+PCDFs+Co-PCBs
Animal fats and oils	2.0 ng-TEQ/kg	3.0 ng-TEQ/kg
Meat-and-bone meal	0.75 ng-TEQ/kg	1.25 ng-TEQ/kg
Fish oil	6.0 ng-TEQ/kg	24.0 ng-TEQ/kg
Fish meal	1.25 ng-TEQ/kg	4.5 ng-TEQ/kg

* To be exact, these values stand for maximum content relative to a feedstuff with a moisture content of 12 %, and are expressed in World Health Organisation (WHO) toxic equivalents, using the WHO-TEFs (toxic equivalency factors), 1997 (*)

(*) WHO-TEFs for human risk assessment based on the conclusions of the World Health Organisation meeting in Stockholm, Sweden, 15-18 June 1997 (Van den Berg et al., (1998) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, and PCDFs for Humans and for Wildlife. Environmental Health Perspectives, 106(12), 775).

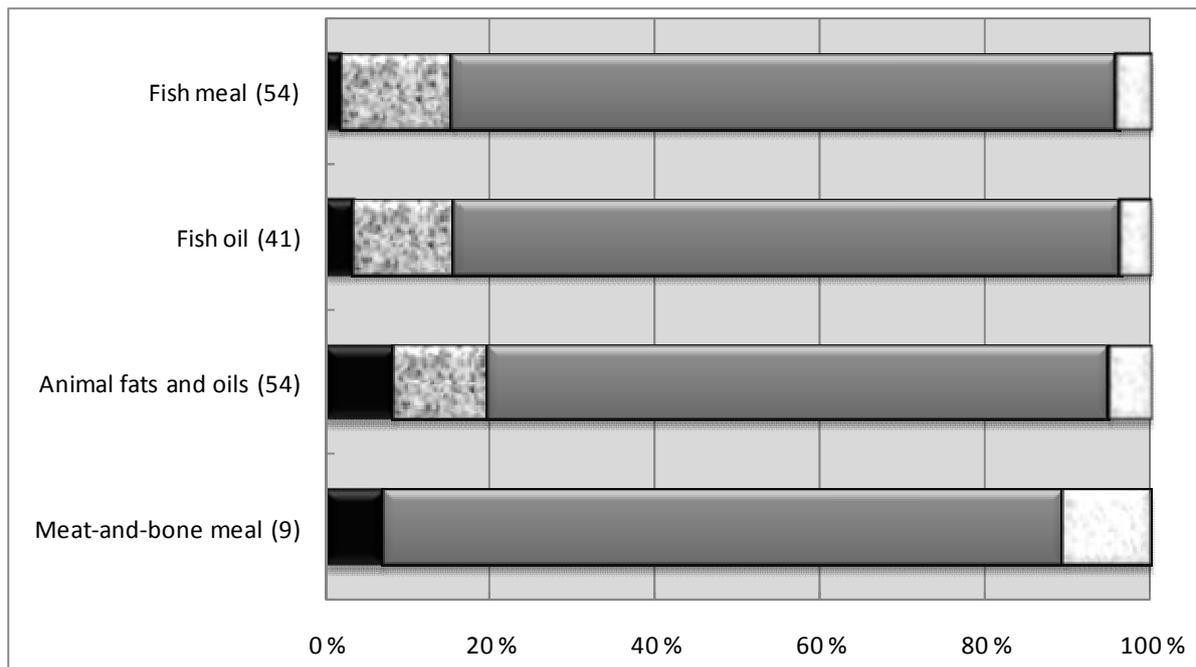


Fig. 1 Contributions of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs
to the total TEQ in feedstuffs of animal by-product

■ PCDDs ■ Non-ortho Co-PCBs
 ■ PCDFs ■ Mono-ortho Co-PCBs

Contribution percentages are calculated with averaged TEQ values for each feedstuff type. Numbers of each feed sample are shown in the parenthesis.

4 まとめ

平成 18~22 年度の飼料中のダイオキシン類のモニタリング結果は、次のとおりであった。

- 1) 魚粉の毒性当量は 0.0006~2.4 ng-TEQ/kg であった。
- 2) 魚油の毒性当量は 0.82~22 ng-TEQ/kg であった。
- 3) 動物性油脂の毒性当量は 0.004~5.2 ng-TEQ/kg であった。なお、最大値を示した 1 検体は、魚油を含有する混合油脂であり、これを除いた 53 検体中のダイオキシン類の総毒性当量は、平均値が 0.18 ng-TEQ/kg（最小 0.004~最大 0.62 ng-TEQ/kg）であった。
- 4) 肉骨粉の毒性当量は 0.0006~0.06 ng-TEQ/kg であった。
- 5) 魚粉、魚油、動物性油脂及び肉骨粉中の Co-PCBs の毒性当量は、各総毒性当量の 80~93 %と最も大きな割合を占め、更にそのうちノンオルト体の Co-PCBs の毒性当量の占める割合は各総毒性当量の 75~83 %であった。
- 6) 平成 18~22 年度にモニタリング調査を行ったすべての飼料の総毒性当量は、EU が定めるダイオキシン類の最大基準値未満であった。

文 献

- 1) 農林水産消費安全技術センター：http://www.famic.go.jp/ffis/feed/sub4_monitoring.html（2011.5 現在）
- 2) 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).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安 第 14729 号 (2009).
- 4) 農林水産省生産局畜産部飼料課長通知：飼料中のダイオキシン類の定量法暫定ガイドライン，15 生畜第 1725 号，平成 15 年 6 月 26 日 (2003).

調査資料**3 特定飼料添加物国家検定結果（平成 22 年度）**

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課

National assay results of specified feed additives (in the fiscal 2010)

飼料安全法（「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」（昭和 28 年 4 月 11 日法律第 35 号）をいう。以下、同じ。）第 5 条第 1 項の規定により、飼料添加物のうち抗生物質製剤は、特定添加物（「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律施行令」（昭和 51 年 7 月 16 日政令第 198 号）第 2 条第 2 号に定められた抗菌性物質製剤をいう。以下、同じ。）として、独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「センター」という。）が農林水産省令（「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令」（昭和 51 年 7 月 24 日農林省令第 35 号）をいう。）で定める方法により行う検定を受け、検定合格証紙が貼付されたものでなければ販売できない。ただし、飼料安全法第 7 条第 1 項の登録を受けた特定飼料等製造業者が製造し、同法第 16 条第 1 項の表示が付されたもの及び同法第 21 条第 1 項の登録を受けた外国特定飼料等製造業者が製造し、同条第 2 項の表示が付されたものは、この限りではない。

平成 22 年度にセンターに対して検定申請があった特定添加物について、検定の結果をとりまとめたので、その概要等を紹介する。また、平成 22 年度中の登録製造業者による製造数量等について併せて紹介する。

1 検定申請業者、品名等

平成 22 年度に申請があった業者別の抗生物質製剤の種類、品名等を第 1 表に示した。

申請は 7 業者からあり、その製造形態等は、①製造用原体または製剤を自社で輸入し、あるいは他社から購入し、製剤を製造しているのが 4 業者、②製剤を輸入し、販売のみを行っているのが 3 業者という内訳であり、国内で製造用原体から製剤までを自社で一貫して製造している業者はなかった。

特定添加物として申請があった抗生物質製剤は 10 種類（前年度 11 種類）で、品名にして 16 銘柄（前年度 24 銘柄）となり前年度に比べて種類及び銘柄数が減少した。そのうち、製造用原体または製剤を海外に依存している抗生物質製剤は 9 種類（前年度 11 種類）、13 銘柄（前年度 21 銘柄）であった。

亜鉛バシトラシン（製剤）、モネンシンナトリウム（製造用原体）、硫酸コリスチン（製造用原体）及びアルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン（製造用原体）は中国から、サリノマイシンナトリウム（製造用原体）は中国、ブルガリア及びブラジルから、クロルテトラサイクリン（製剤）はシンガポールから、リン酸タイロシン（製剤）及びナラシン（製剤）はアメリカから、アビラマイシン（製剤）はイギリスからそれぞれ輸入されており、輸入先国は 6 カ国（前年度 7 カ国）に及んだ。

第1表 検定申請業者及び申請品名一覧（平成22年度）

管内	申請業者名	製造事業場名	抗生物質製剤の種類	飼料級に該当	申請品名	含有力価 mg(力価)/g	備考
本 部	科研製薬株式会社	※	亜鉛バシトラシン	○	バシトラシン-100	100	4,200単位/g
				○	バシトラシン-150	150	6,300単位/g
	ニッチク薬品工業株式会社	相模工場	サリノマイシンナトリウム	○	サリノマイシンTZ100	100	
	日本ニュートリション株式会社	鹿島工場	サリノマイシンナトリウム	○	モネンシンTZ20	200	
	株式会社ティエヌビー	※	クロルテトラサイクリン	○	サコックス100	100	
神 戸	株式会社科学飼料研究所	龍野工場	硫酸コリスチン		コリスチン10%G「明治」	100	
			ノシヘプタイド	○	ノシ-4F	40	
			リン酸タイロシン		タイラン275	275	
	日本イーライリリー株式会社	※	アピラマイシン	○	サーマックス200	200	
			ナラシン	○	モンテバン100	100	
リン酸タイロシン		タイロシン275	275				
福 岡	株式会社科学飼料研究所	日向工場	硫酸コリスチン		硫酸コリスチン「科研」10%G	100	
	コーキン化学株式会社	九州工場	アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン		テーエム-400FA	400	
			サリノマイシンナトリウム	○	コクスタック-100FA	100	
ノシヘプタイド	○	ノシフィード40	40				
計	7業者	8事業場			16銘柄		

注：「製造事業場名」欄に※が付されている業者は、輸入業者に該当する。

2 抗生物質製剤の種類別の合格件数等

平成 22 年度の抗生物質製剤の種類別の合格件数、合格数量及び実量力価換算量を平成 20 年度及び平成 21 年度分とともに第 2 表に示した。

平成 22 年度の検定では、不合格となる抗生物質製剤はなかった。平成 22 年度の合格件数は 194 件、合格数量は 925 トン、その実量力価換算量は 104 トン(力価)で、対前年度比はそれぞれ 90.2 %、96.3 %、95.7 %で、件数、数量及び実量力価換算量ともに減少した。

抗生物質製剤の種類別の合格数量の総計に占める割合は、ナラシンが 28.4 %（前年度 20.5 %）で最も多く、次いで硫酸コリスチンが 23.8 %（前年度 21.3 %）、サリノマイシンナトリウムが 16.7 %（前年度 26.6 %）、アピラマイシンが 10.8 %（前年度 11.2 %）、ノシヘプタイドが 9.6 %（前年度 8.3 %）と、これに続いた。また、実量力価換算量の総計に占める割合では、ナラシンが 25.3 %（前年度 18.1 %）で最も多く、次いで硫酸コリスチンが 21.3 %（前年度 18.9 %）、アピラマイシンが 19.3 %（前年度 17.9 %）、サリノマイシンナトリウムが 14.9 %（前年度 23.6 %）、亜鉛バシトラシンが 5.9 %（前年度 4.1 %）となった。

亜鉛バシトラシン、ナラシン、ノシヘプタイド、硫酸コリスチン及びリン酸タイロシンは、平成 21 年度に比べて、合格数量及び実量力価換算量がいずれも増加した。一方、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、サリノマイシンナトリウム及びモネンシンナトリウムは、いずれも減少した。

また、平成 20 年度から検定実績がないバージニアマイシン、平成 19 年度から検定実績がないフラボフォスフォリポールと平成 17 年度から検定実績がないエフロトマイシン及びセデカマイシンと平成 11 年度から検定実績がないピコザマイシンは、平成 22 年度においても申請はなかった。センデュラマイシンナトリウム、エンラマイシン及びラサロシドナトリウムについては、平成 22 年度に申請はなかったが、飼料安全法第 7 条第 1 項の登録を受けた特定飼料等製造業者による製造が行われている。

なお、平成 19 年度から検定実績がなかったデストマイシン A は、平成 22 年 2 月 4 日付け農林水産省告示第 270 号で、飼料添加物の指定が取り消されている。

第2表 抗生物質製剤の種類別の合格件数、合格数量および実量力価換算量(平成20年度～平成22年度)

類別	抗生物質製剤の種類	平成20年度					平成21年度					平成22年度				
		合格件数	合格数量 kg	構成比 (%)	実量力価 換算量 kg(力価)	構成比 (%)	合格件数	合格数量 kg	構成比 (%)	実量力価 換算量 kg(力価)	構成比 (%)	合格件数	合格数量 kg	構成比 (%)	実量力価 換算量 kg(力価)	構成比 (%)
ポリペプチド系	亜鉛バシトラスリン	13	56,475.0	3.8	6,921.3	4.1	11	38,325.0	4.0	4,423.8	4.1	10	52,260.0	5.6	6,121.0	5.9
	エンラマイシン	15	64,360.0	4.3	5,148.8	3.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	ノシヘプタイド	22	87,920.0	5.9	3,516.8	2.1	20	80,000.0	8.3	3,200.0	3.0	26	88,360.0	9.6	3,534.4	3.4
	バージニアマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
	硫酸コリスチン	54	199,140.0	13.3	19,914.0	11.8	53	204,940.0	21.3	20,494.0	18.9	57	220,360.0	23.8	22,036.0	21.3
小計	104	407,895.0	27.3	35,500.9	21.0	84	323,265.0	33.7	28,117.8	26.0	88	360,980.0	39.0	31,691.4	30.6	
テトラサイクリン系	7-メチルテトラサイクリン	1	2,000.0	0.1	800.0	0.5	2	2,520.0	0.3	1,008.0	0.9	1	2,000.0	0.2	800.0	0.8
	クロルテラサイクリン	3	12,000.0	0.8	1,200.0	0.7	3	12,000.0	1.2	1,200.0	1.1	3	12,000.0	1.3	1,200.0	1.2
	小計	4	14,000.0	0.9	2,000.0	1.2	5	14,520.0	1.5	2,208.0	2.0	4	14,000.0	1.5	2,000.0	1.9
マクロライド系	リン酸タイロシン	3	14,822.0	1.0	4,076.1	2.4	4	20,477.0	2.1	5,631.2	5.2	4	21,588.0	2.3	5,936.8	5.7
	小計	3	14,822.0	1.0	4,076.1	2.4	4	20,477.0	2.1	5,631.2	5.2	4	21,588.0	2.3	5,936.8	5.7
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリボル	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	小計	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	91	364,840.0	24.4	36,484.0	21.6	64	255,400.0	26.6	25,540.0	23.6	38	154,120.0	16.7	15,412.0	14.9
	センデュラマイシンナトリウム	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	ナラシン	21	222,575.0	14.9	22,257.5	13.2	18	196,525.0	20.5	19,652.5	18.1	24	262,725.0	28.4	26,272.5	25.3
	モネンシンナトリウム	42	162,080.0	10.8	32,416.0	19.2	8	30,360.0	3.2	6,072.0	5.6	4	11,600.0	1.3	2,320.0	2.2
	ラサロシドナトリウム	27	106,300.0	7.1	15,945.0	9.4	3	11,780.0	1.2	1,767.0	1.6	0	0.0	0.0	0.0	0.0
	小計	181	855,795.0	57.2	107,102.5	63.3	93	494,065.0	51.5	53,031.5	49.0	66	428,445.0	46.3	44,004.5	42.5
その他	アピラマイシン	55	204,000.0	13.6	20,400.0	12.1	29	107,950.0	11.2	19,347.5	17.9	27	100,050.0	10.8	20,010.0	19.3
	エフロトマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	セデカマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	ビコザマイシン	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	小計	55	204,000.0	13.6	20,400.0	12.1	29	107,950.0	11.2	19,347.5	17.9	27	100,050.0	10.8	20,010.0	19.3
総計	347	1,496,512.0	100.0	169,079.4	100.0	215	960,277.0	100.0	108,335.9	100.0	194	925,063.0	100.0	103,642.7	100.0	
対前年度比 (%)	107.4	109.9		108.2		62.0	64.2		64.1		90.2	96.3		95.7		

3 精製級及び飼料級別の合格件数等

飼料添加物に指定された抗生物質製剤は、培養後の製造方法の違いにより、精製級と飼料級に区分される。前者は、抗生物質の有効成分のみを培養液から抽出、精製した比較的純度の高い製造用原体に由来するもので、後者は、抗生物質の有効成分、製造に用いた培地成分及び菌体成分を含む培養液を乾燥した比較的純度の低い製造用原体に由来するものである。

平成22年度の精製級及び飼料級の抗生物質製剤の合格件数、合格数量及び実量力価換算量を第3表に示した。

精製級及び飼料級の抗生物質製剤の割合を実量力価換算量で比較すると、飼料級の製剤が全体の70.0%（前年度66.0%）を占めた。

ノシヘプタイド、硫酸コリスチン及びサリノマイシンナトリウムは、精製級及び飼料級の規格がそれぞれ設定されているが、平成22年度では、硫酸コリスチンは精製級のみ、ノシヘプタイド及びサリノマイシンナトリウムは飼料級のみが申請されている。

第3表 精製級・飼料級別の合格件数, 合格数量及び実量力価換算量(平成22年度)

類別	抗生物質製剤の種類	精製級			飼料級		
		合格件数 件	合格数量 kg	実量力価換算量 kg(力価)	合格件数 件	合格数量 kg	実量力価換算量 kg(力価)
ポリペプチド系	亜鉛バシトラシン	—	—	—	10	52,260.0	6,121.0
	エンラマイシン	—	—	—	0	0.0	0.0
	ノシヘブタイド	0	0.0	0.0	26	88,360.0	3,534.4
	バージニアマイシン	0	0.0	0.0	—	—	—
	硫酸コリスチン	57	220,360.0	22,036.0	0	0.0	0.0
テトラサイクリン系	アルキルリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン	1	2,000.0	800.0	—	—	—
	クロルテトラサイクリン	—	—	—	3	12,000.0	1,200.0
マクロライド系	リン酸タイロシン	4	21,588.0	5,936.8	—	—	—
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリポール	—	—	—	0	0.0	0.0
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	0	0.0	0.0	38	154,120.0	15,412.0
	センデュラマイシンナトリウム	0	0.0	0.0	—	—	—
	ナラシン	—	—	—	24	262,725.0	26,272.5
	モネンシンナトリウム	4	11,600.0	2,320.0	—	—	—
	ラサロシドナトリウム	0	0.0	0.0	—	—	—
その他	アビラマイシン	—	—	—	27	100,050.0	20,010.0
	エフロトマイシン	0	0.0	0.0	—	—	—
	セデカマイシン	0	0.0	0.0	—	—	—
	ピコザマイシン	0	0.0	0.0	—	—	—
合計		66	255,548.0	31,092.8	128	669,515.0	72,549.9
割合 (%)		34.0	27.6	30.0	66.0	72.4	70.0

4 抗生物質製剤の類別の合格数量等の推移等

平成 13 年度から平成 22 年度までの過去 10 年間における抗生物質製剤の類別の合格数量及び実量力価換算量の推移を図 1 及び図 2 に示した。

抗生物質製剤の類別の合格数量は、平成 16 年度をピークに増減を繰り返しながら減少傾向にあったが、平成 20 年度から平成 21 年度にかけて大幅に減少し、平成 22 年度は過去 10 年間で最低となった。また、実量力価換算量についても同様の傾向で、平成 20 年度から平成 21 年度にかけて大幅に減少し（減少率前年度比 64 %）、平成 22 年度に過去 10 年間で最低となった。なお、平成 19 年度から 1 種類、さらに平成 21 年度から 5 種類の特定添加物について登録特定飼料等製造業者による製造が行われている。

抗生物質製剤の類別の実量力価換算量は、平成 13 年度以降、ポリエーテル系が全体の半数を超える割合で推移しているが、平成 22 年度は全体の 42.5 %（前年度 49.0 %）を占め、ポリペプチド系が 30.6 %（前年度 26.0 %）でそれに続いた。

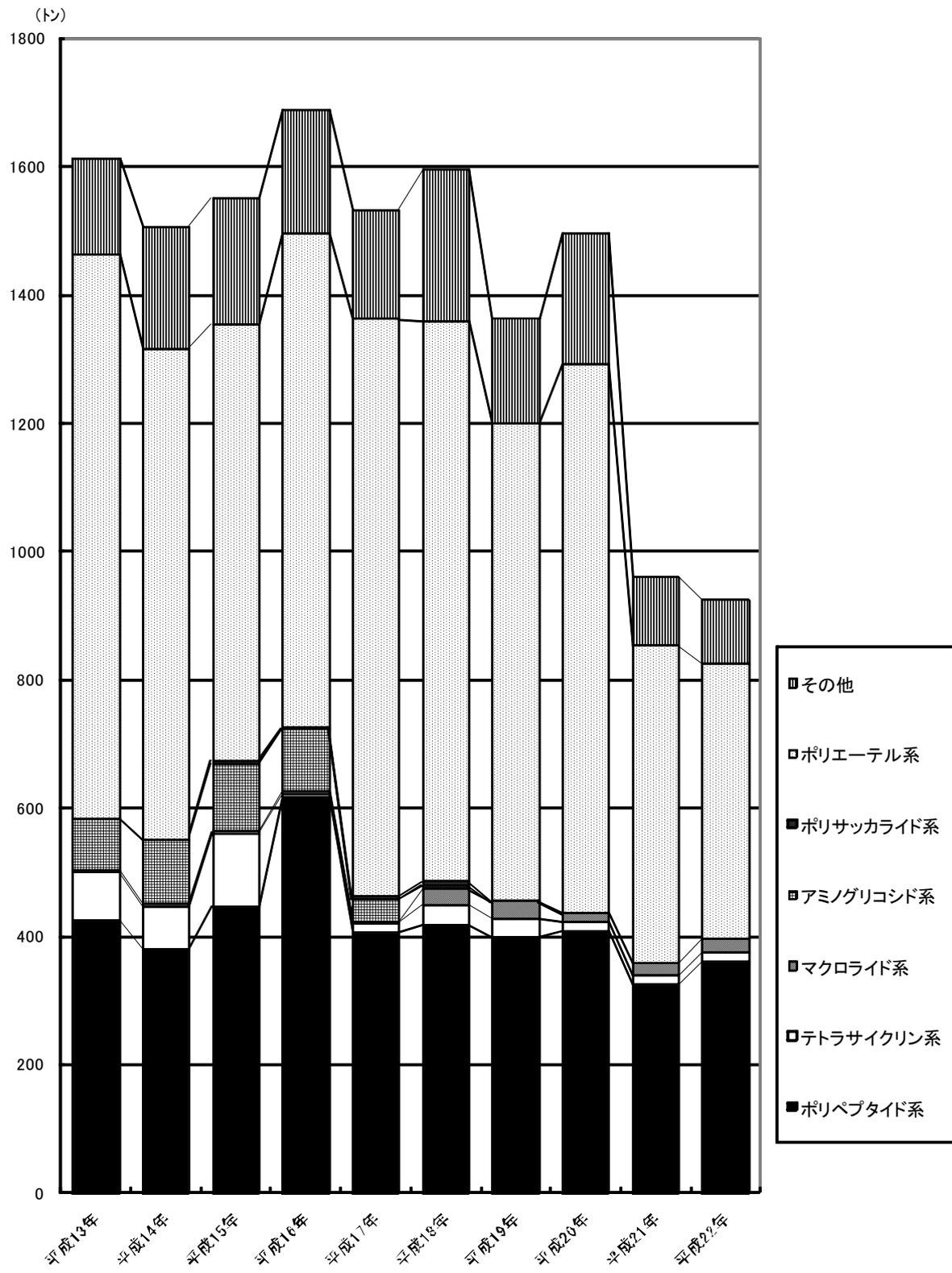


図1 抗生物質製剤の類別の検定合格数量

(トンカ価)

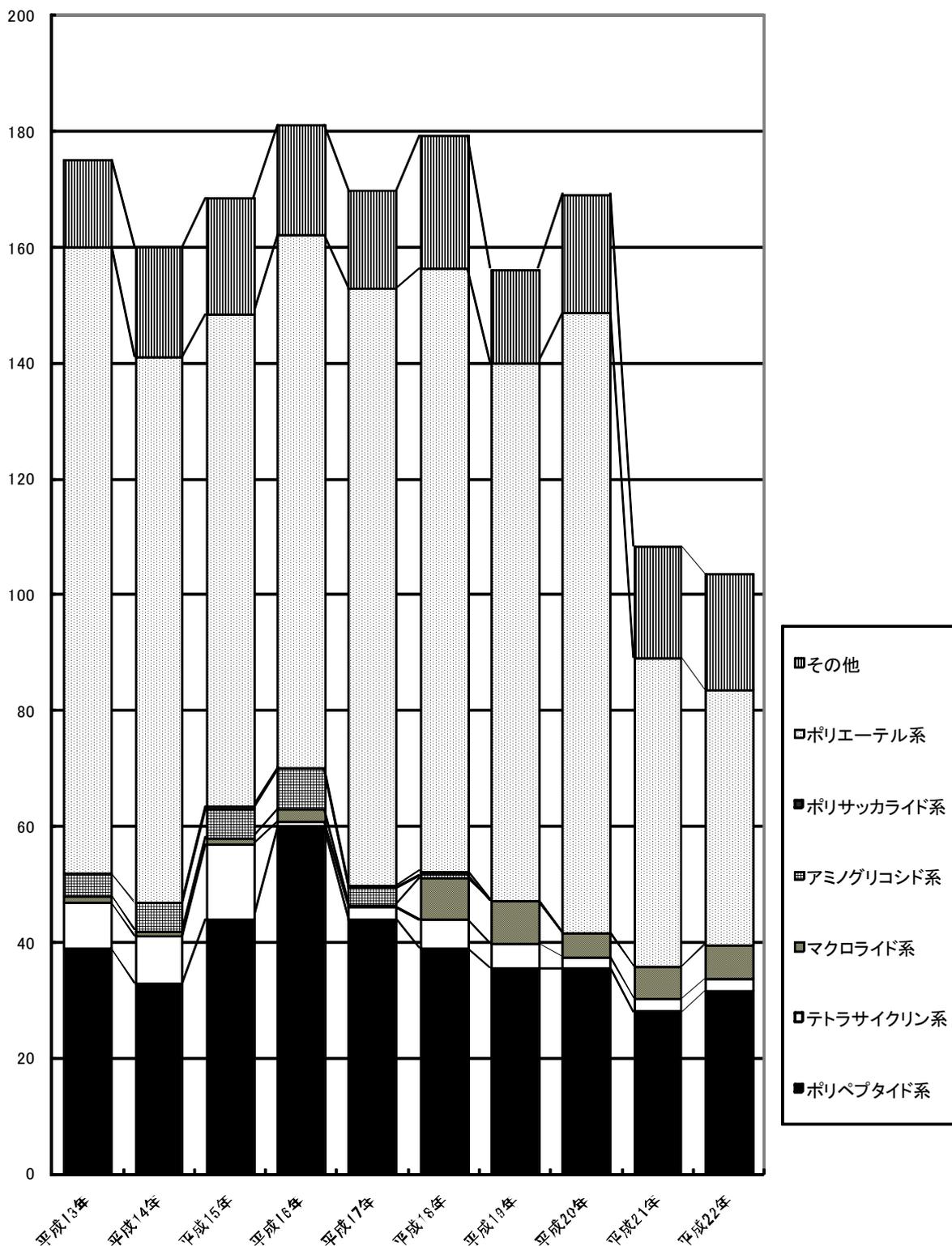


図 2 抗生物質製剤の類別の実量力価換算量

5 地域センター別の合格件数等

センター本部及び各地域センター別の合格件数，合格数量及び実量力価換算量を第4表に示した。

平成22年度の合格件数，合格数量及び実量力価換算量は，神戸センター管内が最も多く，次いで福岡センター，本部の順となった。

各センター管内ともに，合格件数，合格数量及び実量力価換算量が前年度より減少した。

なお，平成19年度から実績がない名古屋センター管内，平成17年度から実績がない札幌センター管内及び平成7年度から実績がない仙台センター管内では，平成22年度も申請はなかった。

第4表 センター別の合格件数，合格数量
および実量力価換算量(平成22年度)

管内	合格件数 件	合格数量 kg	実量力価換算量 Kg(力価)
本部	41 (43)	173,980 (165,305)	19,453 (17,826)
札幌	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)
仙台	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)
名古屋	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)
神戸	94 (111)	518,403 (556,752)	64,642 (70,732)
福岡	59 (61)	232,680 (238,220)	19,548 (19,778)
計	194 (215)	925,063 (960,277)	103,643 (108,336)

注:()内の数値は、平成21年度を示す。

6 登録特定飼料等製造業者の製造数量等

飼料安全法第7条第1項の規定に基づき，平成19年度にセンデュラマイシンナトリウムに係る特定飼料等製造業者の事業場としてコーキン化学株式会社九州工場第3工場が，平成21年度にサリノマイシンナトリウム，モネンシンナトリウム，ラサロシドナトリウム，エンラマイシン及び硫酸コリスチンに係る特定飼料等製造業者の事業場として株式会社科学飼料研究所龍野工場が登録され製造を行っている。

コーキン化学株式会社九州工場第3工場ではセンデュラマイシンナトリウムについて1銘柄が製造されており，平成22年度の製造数量は12,000 kgで，実量力価換算量は600 kg(力価)であった。

株式会社科学飼料研究所龍野工場ではサリノマイシンナトリウムについて2銘柄が製造され，平成22年度の製造数量は357,060 kgで実量力価換算量は35,706 kg(力価)，モネンシンナトリウムについて2銘柄が製造され，平成22年度の製造数量は177,440 kgで実量力価換算量は35,488 kg(力価)，ラサロシドナトリウムについて2銘柄が製造され，平成22年度の製造数量は88,900 kgで実量力価換算量は13,335 kg(力価)，エンラマイシンについて1銘柄が製造され，平成22年度の製造数量は62,780 kgで実量力価換算量は5,022 kg(力価)，硫酸コリスチンについては1銘柄

が製造され、平成 22 年度の製造数量は 5,600 kg で実量力価換算量は 560 kg（力価）であった。

登録特定飼料等製造業者の製造数量等について、平成 22 年度の合計は製造数量で 704 トン（対前年度比 163 %）、実量力価換算量で 91 トン（対前年度比 155 %）であり、平成 20 年度から引き続き増加傾向にあった。

7 要 約

平成 22 年度の特定期間物の検定結果は、以下のとおりであった。

- (1) 検定は 7 業者から、10 種類の抗生物質製剤について、16 銘柄の申請があった。
- (2) 製造用原体または製剤を海外に依存している抗生物質製剤は、9 種類、13 銘柄であった。
- (3) 合格件数は 194 件、合格数量は 925 トン、その実量力価換算量は 104 トン（力価）で、前年度に比べて、件数、数量及び実量力価換算量ともに減少した。
- (4) 合格数量が多い抗生物質製剤は、ナラシン（28.4 %）で、硫酸コリスチン、サリノマイシンナトリウム、アピラマイシン、ノシヘプタイドがこの順で続いた。
- (5) 実量力価換算量が多い抗生物質製剤は、ナラシン（25.3 %）で、硫酸コリスチン、アピラマイシン、サリノマイシンナトリウム、亜鉛バシトラシンがこの順で続いた。
- (6) 合格したものについて実量力価換算量で精製級及び飼料級の製剤の割合を比較すると、飼料級の製剤が全体の 70.0 %を占めた。
- (7) 合格したものについて過去 10 年間の実量力価換算量の推移をみると、平成 16 年度以降増減を繰り返しながら減少傾向にあり、平成 21 年度に過去 10 年間で最大の減少率（前年度比 64 %）を示し、平成 22 年度はさらに減少し過去 10 年間で最低となった。
- (8) 地域センター別の合格件数、合格数量及び実量力価換算量は、神戸センター管内が最も多かった。
- (9) センデュラマイシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、エンラマイシン及び硫酸コリスチンについて、登録特定飼料等製造業者による製造が行われ、合計量としては製造数量及び実量力価換算量共に平成 20 年度から引き続き増加傾向にあった。

他誌掲載論文

(抄録)

- 1 Four-Year Surveillance for Ochratoxin A and Fumonisins in Retail Foods in Japan
Koji AOYAMA, Masahiro NAKAJIMA, Setsuko TABATA, Eiichi ISHIKURO,
Toshitsugu TANAKA, Hiroko NORIZUKI, Yoshinori ITOH, Kazuhiro FUJITA,
Shigemi KAI, Toru TSUTSUMI, Masanori TAKAHASHI, Hiroki TANAKA,
Seiichiro IIZUKA, Motoki OGISO, Mamoru MAEDA, Shigeaki YAMAGUCHI,
Keiichi SUGIYAMA, Yoshiko SUGITA-KONISHI and Susumu KUMAGAI
Journal of Food Protection, 73(2), 344–352 (2010).

- 2 Simultaneous analysis of organic acids and inorganic anions in silage by capillary electrophoresis
Hisaki HIRAOKA, Eiichi ISHIKURO and Tetsuhisa GOTO
Animal Feed Science and Technology, 161, 58–66 (2010).

- 3 PCR-RFLP Identification of Prohibited Animal Derived DNA in Animal Feed
Naoki SHINODA, Yoshiyasu HASHIMOTO, Masami TAKAGI, Fumio KOJIMA,
Takashi ONODERA and Katsuaki SUGIURA
食品衛生学雑誌, 52(1), 24-27 (2011).

- 4 Guidelines used in Japan to prevent the contamination of feed products with undesirable substances
Masami TAKAGI, Shoichi YAMATANI and Katsuaki SUGIURA
Veterinaria Italiana, 47(1), 49-52 (2011).

Article No. 1: Reprinted with permission from the *Journal of Food Protection*. Copyright held by the International Association for Food Protection, Des Moines, Iowa, U.S.A. Please include the name and affiliation of the authors.

上記 2, 4 の論文は、抄録掲載の許可をとって掲載しています。

飼料研究報告編集委員

委員長	竹原 敏郎	副委員長	飯田 健雄
	石橋 隆幸		中村 行伸
	小嶋 二三夫		橋本 亮
	小森谷 敏一		牧野 大作
	佐々木 隆		松崎 学
	高木 昌美		山谷 昭一
	田中 公子		

飼料研究報告 第36号

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

平成23年8月

編集 飼料研究報告編集委員会