

# 飼料研究報告

第46号

令和3年

## Research Report of Animal Feed

Vol. 46  
2021



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



## はしがき

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

飼料及びペットフードについては、農林水産省等の関係府省が「飼料安全法」及び「ペットフード安全法」に基づく基準規格（残留農薬、有害物質、添加物など）を設定し、飼料等の関係事業者がこの基準規格を遵守することにより、飼料等の安全確保が図られています。これらの法律に基づく基準規格の設定に当たっては、先ずはその目的に応じた性能（選択性、検量線の直線性、真度、精度、検出限界と定量限界など）を有する試験法により、科学的に信頼できるデータを得ることが重要です。

このため、FAMIC では飼料等の分析法の開発、改良等を行うとともに、分析法の妥当性確認を行い、公定分析法を確立しています。また、確立した公定分析法を用いて飼料等のサーベイランス・モニタリングを行い、有害物質による汚染実態の把握や基準規格の遵守状況の確認を行うことを通じて、飼料等の安全確保に貢献しています。さらに、FAMIC の飼料部門は、国際獣疫事務局（OIE）の「飼料の安全と分析」分野のコラボレーティング・センターとして、飼料の安全と分析に関する技術情報の発信や研修等の実施などを通じて、安全な畜産物の国際取引の確保等に寄与しています。

『飼料研究報告』は、FAMIC の飼料部門における飼料及び飼料添加物並びにペットフードの分析及び鑑定技術の改善、検査手法・試験法の開発又は改良等を目指して実施した調査・研究成果や学術雑誌等に投稿等して公表した研究成果を取りまとめたものです。これらの研究成果は「飼料分析基準」（平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号。農林水産省消費・安全局長通知）又は「愛玩動物用飼料等の検査法」（平成 21 年 9 月 1 日付け 21 消技第 1764 号。FAMIC 理事長制定）に記載されるほか、『飼料分析法・解説 -2009-』（飼料分析基準研究会編書）の改訂の際に掲載される予定です。

最後に、本研究報告が飼料及び飼料添加物並びにペットフードの安全の確保の一助となることを期待するとともに、関係各位におかれては、FAMIC の技術レベルの更なる向上のために、引き続き、御指導、御鞭撻を賜りますよう、お願い申し上げます。なお、本号については、新型コロナウイルスが猛威を振るい、在宅勤務等の感染拡大防止対策を徹底したことにより、計画的に業務を進めることが大きく制約され、また、感染に対する不安がある中、職員一人一人が使命感を持って、担当した課題に取り組んだ成果がまとめられたものであることを申し添えます。

令和 3 年 9 月

理事長 木内 岳志

## 謝 辞

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

令和2年度飼料分析基準検討会委員  
(敬称略。五十音順。役職は令和3年3月現在。)

- |       |  |
|-------|--|
| 石黒 瑛一 | 一般財団法人日本食品分析センター 顧問                      |
| 永西 修  | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構<br>畜産研究部門 研究推進部長 |
| 小池 良治 | 農林水産省動物医薬品検査所 検査第二部 総括上席研究官              |
| 後藤 哲久 | AOAC インターナショナルフェロー                       |
| 坂 真智子 | 一般財団法人残留農薬研究所 参事                         |
| 永山 敏廣 | 明治薬科大学 特任教授                              |
| 堀江 正一 | 大妻女子大学 家政学部 食物学科 教授                      |
| 松井 徹  | 国立大学法人京都大学大学院 農学研究科 教授                   |
| 松井 利郎 | 国立大学法人九州大学 農学研究院 教授                      |
| 安井 明美 | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構<br>食品研究部門 アドバイザー |

# 目 次

1 大豆及び大豆油かす中の含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の開発及び共同試験 齊木 雅一, 顯谷 久典, 宮野谷 杏 .....	1
2 稲発酵粗飼料中のデオキシニバレノール及びゼアラレノンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発 鈴木 知華 .....	22
3 脱脂粉乳中のシアヌル酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発 沼田 歩美, 大島 慎司, 高橋 雄一 .....	32
4 飼料及び愛玩動物用飼料中の砒素, カドミウム, 鉛及び水銀の誘導結合プラズマ質量分析計による迅速・多元素同時分析法の開発 伊藤 紗織, 林 菜月 .....	45
5 飼料中のフィプロニルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の追加検討及び共同試験 武田 然也, 倉島 ちなみ, 白井 小枝, 名塚 英一, 牧野 大作 .....	57
6 稲わら及び粃米中のヒドロキシイソキサゾールの液体クロマトグラフ質量分析計による分析法の共同試験 牧野 大作, 土井 雄悟, 田島 麻帆.....	72
7 カルタップの液体クロマトグラフ質量分析計による分析法の適用範囲をイアコーンサイレージに拡大するための妥当性確認 関口 好浩, 板橋 葵.....	80

## 調査資料

1 飼料中の有害物質等のモニタリング等の結果について (令和2年度) 肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課 .....	88
2 特定添加物検定結果等について (令和2年度) 肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課 .....	109

他誌掲載論文 (抄録)

- 1 Development of a simultaneous quantification method for ten trichothecenes including deoxynivalenol-3-glucoside in feed

M. Nomura, K. Shidara, I. Yasuda, K. Aoyama, A. Takahashi,  
T. Ishibashi

(Mycotoxin Research, 36 (4), 353–360 (2020).) ..... 121

## CONTENTS

1	Development and Collaborative Study of Simultaneous Determination Method of Phosphorus-Containing Amino-Acid-Based Pesticides in Soybeans and Soybean Meal by LC-MS/MS	SAIKI Masakazu, ARAYA Hisanori and MIYANOYA Kyo	1
2	Development of Determination Method of Deoxynivalenol and Zearalenone in Whole-Crop Rice Silage by LC-MS/MS	SUZUKI Chika	22
3	Development of Determination Method of Cyanuric Acid in Dried Skim Milk by LC-MS/MS	NUMATA Ayumi, OSHIMA Shinji and TAKAHASHI Yuichi	32
4	Development of Rapid Simultaneous Determination Method of Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury in Feed and Pet Food by ICP-MS	ITOU Saori and HAYASHI Natsuki	45
5	Additional Consideration and Collaborative Study of Determination Method of Fipronil in Feed by LC-MS/MS	TAKEDA Zenya, KURASHIMA Chinami, SHIRAI Sae, NAZUKA Eiichi and MAKINO Daisaku	57
6	Collaborative Study of Determination Method of Hydroxyisoxazol in Rice Straw and Paddy Rice for Feed by LC-MS	MAKINO Daisaku, DOI Yugo and TASHIMA Maho	72
7	Validation Study on Application of Cartap Determination Method by LC-MS to Ear-Corn Silage	SEKIGUCHI Yoshihiro and ITABASHI Aoi	80
§ Investigative report			
1	Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2020)	Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	88
2	Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2020)	Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	109

§ Papers accepted in other journals (abstract)

- 1 Development of a simultaneous quantification method for ten trichothecenes including deoxynivalenol-3-glucoside in feed

M. Nomura, K. Shidara, I. Yasuda, K. Aoyama, A. Takahashi,  
T. Ishibashi

(Mycotoxin Research, 36 (4), 353–360 (2020).) ..... 121

# 1 大豆及び大豆油かす中の含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の開発及び共同試験

齊木 雅一<sup>\*1</sup>, 顯谷 久典<sup>\*2</sup>, 宮野谷 杏<sup>\*2</sup>

## Development and Collaborative Study of Simultaneous Determination Method of Phosphorus-Containing Amino-Acid-Based Pesticides in Soybeans and Soybean Meal by LC-MS/MS

SAIKI Masakazu<sup>\*1</sup>, ARAYA Hisanori<sup>\*2</sup> and MIYANOYA Kyo<sup>\*2</sup>

(\*<sup>1</sup> Sapporo Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) (Now Hokkaido District Agriculture Office, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan)

<sup>\*2</sup> Sapporo Regional Center, FAMIC)

We have developed a quantitative determination method of the concentration of phosphorus-containing amino-acid-based pesticides in soybeans and soybean meal using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS), and conducted a collaborative study.

Phosphorus-containing amino-acid-based pesticides in soybeans and soybean meal were extracted with water and the extract was centrifuged. The supernatant was diluted with acetone and centrifuged. The supernatant was then purified with two types of SPE columns (Oasis HLB and Oasis Plus MCX, Waters Co.; Milford, MA, USA). Having derivatized these compounds with trimethyl orthoacetate, the sample solution was purified with two types of SPE columns (Sep-Pak Plus NH2 and Silica, Waters Co.), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of phosphorus-containing amino acid-based pesticides. LC separation was then carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) with a gradient of 0.01 v/v % formic acid solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on soybean, kinako (roasted soybean flour) and soybean meal. Glyphosate (GLYP) and *N*-acetylgliphosate were intentionally added at the levels of 0.04 and 20 mg/kg, and glufosinate (GLUF), *N*-acetylglufosinate and 3-(methyl phosphinico) propionic acid (MPPA) were intentionally added at the levels of 0.05 and 2 mg/kg respectively. The resulting mean recoveries ranged from 82.3 % to 115 % for GLYP, 84.5 % to 110 % for *N*-acetylgliphosate, 80.9 % to 111 % for GLUF, 86.0 % to 117 % for *N*-acetylglufosinate, and 79.1 % to 113 % for MPPA respectively. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub>) was less than 18 % for GLYP, less than 15 % for *N*-acetylgliphosate, less than 12 % for GLUF, less than 18 % for *N*-acetylglufosinate, and less than 11 % for MPPA.

A collaborative study was conducted by eight laboratories using two kinds of soybeans, kinako and three kinds of soybean meal, all of which were added with GLYP, GLUF and MPPA according to the following specifications: the first soybean was spiked with 0.2 mg/kg of GLYP, and 0.1 mg/kg of GLUF and MPPA, the second soybean was spiked with 20 mg/kg of GLYP, and 2 mg/kg of GLUF and MPPA; kinako was spiked with 5 mg/kg of GLYP, and 0.5 mg/kg of GLUF and MPPA; the first soybean meal was spiked with 1 mg/kg of GLYP, and 0.2 mg/kg of GLUF and MPPA, while the

\*<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター, 現 農林水産省北海道農政事務所

\*<sup>2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

second soybean meal was spiked with 12 mg/kg of GLYP, and 1.5 mg/kg of GLUF and MPPA, and finally the third soybean meal was spiked with 24 mg/kg of GLYP, and 2.5 mg/kg of GLUF and MPPA. The resulting mean recoveries ranged from 84.9 % to 98.3 % for GLYP, 94.3 % to 105 % for GLUF and 102 % to 117 % for MPPA. The repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation ( $RSD_r$  and  $RSD_R$ ) were less than 13 % and less than 17 % for GLYP, less than 13 % and less than 23 % for GLUF, less than 20 % and less than 26 % for MPPA respectively. The HorRat was less than 1.6 for GLYP, less than 1.3 for GLUF, and less than 1.6 for MPPA.

This method was thus validated as useful for inspections of phosphorus-containing amino acid-based pesticides in soybeans and soybean meal.

**Key words:** phosphorus-containing amino-acid-based pesticide; glyphosate; glufosinate; 3-(methyl phosphinico) propanoic acid; *N*-acetylglyphosate; *N*-acetylglufosinate; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); soybean; soybean meal; collaborative study

**キーワード:** 含リンアミノ酸系農薬; グリホサート; グルホシネート; 3-メチルホスフィニコプロピオン酸; *N*-アセチルグリホサート; *N*-アセチルグルホシネート; 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計; エレクトロスプレーイオン化法; 大豆; 大豆油かす; 共同試験

## 1 緒 言

グリホサート（以下「GLYP」という．）は Monsanto Company（米国）が開発した非選択性茎葉処理型のアミノ酸系除草剤であり、たん白質合成に必須の芳香族アミノ酸の合成を阻害することにより殺草活性を示す．GLYP 耐性遺伝子組換え植物中では *N*-アセチルグリホサートに代謝されることが知られている<sup>1)</sup>．

グルホシネート（以下「GLUF」という．）は Hoechst AG（ドイツ）が開発した非選択性茎葉処理型のアミノ酸系除草剤であり、植物中でグルタミン合成酵素を阻害することにより殺草活性を示す．また、GLUF は、非遺伝子組換え植物中では 3-メチルホスフィニコプロピオン酸（以下「MPPA」という．）、GLUF 耐性遺伝子組換え植物中では *N*-アセチルグルホシネートに代謝されることが知られている<sup>2)</sup>．

現在、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律<sup>3)</sup>に基づき農林水産大臣が安全性を確認した GLYP 耐性遺伝子及び GLUF 耐性遺伝子を持つとうもろこしや大豆が飼料用として流通している．

GLYP の国内における飼料中の残留基準値<sup>4)</sup>は、大麦、えん麦及びマイロで 20 mg/kg、小麦で 5 mg/kg、とうもろこしで 1 mg/kg、ライ麦で 0.2 mg/kg 並びに牧草で 120 mg/kg と定められている．また、農林水産省局長通知による飼料の有害物質の管理基準値<sup>5)</sup>は、稲わら及び稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という．）で 0.2 mg/kg と定められている．

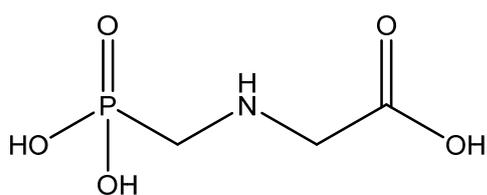
GLUF の飼料中の残留基準値<sup>4)</sup>は、穀類においては GLUF、MPPA を GLUF に換算したものと及び *N*-アセチルグルホシネートを GLUF に換算したものの総和として定められており、大麦で 0.5 mg/kg、小麦で 0.2 mg/kg 及びとうもろこしで 0.1 mg/kg である．また、飼料の有害物質の管理基準値<sup>5)</sup>は、稲わらで 0.5 mg/kg 及び WCRS で 0.1 mg/kg と定められている．

これら含リンアミノ酸系農薬の飼料中の分析法としては、飼料分析基準<sup>6)</sup>に記載された含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という．）による同時分析法<sup>7)-10)</sup>（以下「収載法」という．）があるが、大豆及び大豆油かすは適用範囲に含まれ

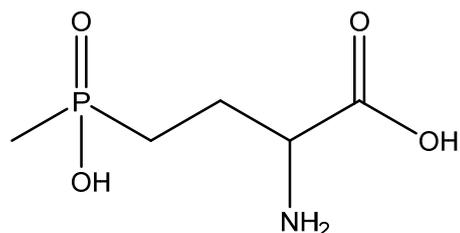
ていない。

平成 30 年度に筆者らは、収載法の適用範囲を大豆及び大豆油かすに拡大するための妥当性を検証したところ<sup>7)</sup>、大豆については抽出液が白濁しており、カラムの目詰まりが生じて以降の操作が行えなかった。また、大豆油かすについては、マトリックス効果によるイオン化促進のため、回収率が飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度の目標値を満たさなかった。今回、収載法を改良するとともに、共通試料を用いた共同試験を実施し、飼料分析基準への収載の可否を検討したので、その概要を報告する。

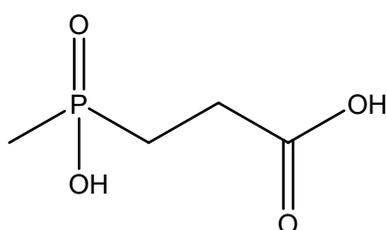
なお、飼料分析基準では、単に GLUF と記載した場合はアンモニウム塩を指すと規定されていることから、GLUF と記載した場合には同様の扱いとした。また、*N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチルグルホシネートは、それぞれ GLYP 及び GLUF のアセチル体であり、分析操作の過程で親成分と同一の誘導体になることから、*N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチルグルホシネートについては共同試験を実施せず、GLYP、GLUF 及び MPPA について実施することとした。



Glyphosate (GLYP)

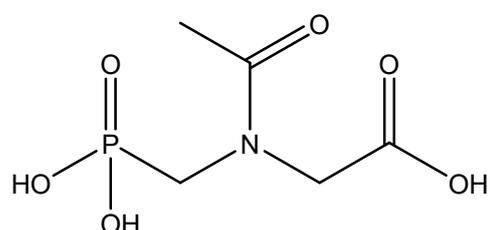
*N*-(phosphonomethyl)glycineC<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub>P MW: 169.1 CAS No.: 1071-83-6

Glufosinate (GLUF)

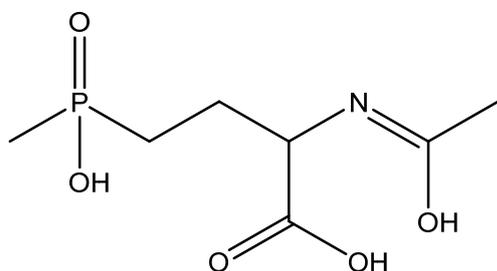
*(2RS)*-2-amino-4-[hydroxy(methyl)phosphinoyl]butyric acidC<sub>5</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>P MW: 181.1 CAS No.: 51276-47-2

3-(methylphosphinico)propionic acid (MPPA)

3-(methylphosphinico)propionic acid

C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>P MW: 152.1 CAS No.: 15090-23-0*N*-acetylglyphosate

2-[acetyl(phosphonomethyl)amino]acetic acid

C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>6</sub>P MW: 211.1 CAS No.: 129660-96-4*N*-acetylglufosinate*(2RS)*-2-acetamido-4-[hydroxy(methyl)phosphinoyl]

butyric acid

C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub>P MW: 223.2 CAS No.: 73634-73-8Fig. 1 Chemical structures of GLYP, GLUF, MPPA, *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate

## 2 実験方法

### 2.1 分析法開発

#### 2.1.1 試料

大豆及び大豆油かすは、それぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し、分析用試料とした。きな粉はそのまま分析用試料として使用した。

## 2.1.2 試薬

- 1) メタノール, アセトン及び酢酸エチルは残留農薬・PCB 試験用を用いた. オルト酢酸トリメチルは東京化成工業製 (純度 98.0 %以上) を用いた. 酢酸は試薬特級を用いた. アセトニトリルは LC-MS 用 (関東化学製) を用いた. ギ酸は LC-MS 用 (富士フイルム和光純薬製) を用いた. 水は Milli-Q Direct8 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた. メタノールは液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業製) を用いた.
- 2) GLYP 標準原液  
グリホサート標準品 (富士フイルム和光純薬製, 純度 99.3 %) 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて GLYP 標準原液を調製した (この液 1 mL は, GLYP として 1 mg を含有) .
- 3) GLUF 標準原液  
グルホシネートアンモニウム標準品 (Dr.Ehrenstorfer GmbH 製, 純度 99.2 %) 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて GLUF 標準原液を調製した (この液 1 mL は, GLUF として 1 mg を含有) .
- 4) MPPA 標準原液  
MPPA 標準品 (富士フイルム和光純薬製, 純度 99.9 %) 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて MPPA 標準原液を調製した (この液 1 mL は, MPPA として 1 mg を含有) .
- 5) *N*-アセチルグリホサート標準原液  
*N*-アセチルグリホサート標準品 (Tronto Research Chemicals 製, 純度 97 %) 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて *N*-アセチルグリホサート標準原液を調製した (この液 1 mL は, *N*-アセチルグリホサートとして 1 mg を含有) .
- 6) *N*-アセチルグルホシネート標準原液  
*N*-アセチルグルホシネートナトリウム標準品 (Tronto Research Chemicals 製, 純度 95 %) 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて *N*-アセチルグルホシネート標準原液を調製した (この液 1 mL は, *N*-アセチルグルホシネートとして 0.836 mg を含有) .
- 7) 検量線作成用混合標準原液  
GLYP 標準原液, GLUF 標準原液及び MPPA 標準原液 1 mL を 10 mL の全量フラスコに入れて混合し, 更に標線まで水を加えて検量線作成用混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, GLYP, GLUF 及び MPPA として各 100 µg を含有) .
- 8) 0.01 v/v%ギ酸溶液  
ギ酸 1 mL に水を加えて 1 L とし, 更にこの液 100 mL に水を加えて 1 L とした.

## 2.1.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機 : ZM 200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)
- 2) 振とう機 : レシプロシェーカー SR-2W タイテック製 (使用時振とう数 300 rpm)
- 3) ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム : Oasis HLB カートリッジ (充てん剤量 500 mg) Waters 製にリザーバー (容量 6 mL) を連結したもの

- 4) スルホン酸修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム : Oasis Plus MCX カートリッジ (充てん剤量 225 mg) Waters 製
- 5) アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム : Sep-Pak Plus NH2 カートリッジ (充てん剤量 360 mg) Waters 製にリザーバー (容量 10 mL) を連結したもの
- 6) シリカゲルミニカラム : Sep-Pak Plus Silica カートリッジ (充てん剤量 690 mg) Waters 製
- 7) LC-MS/MS :  
LC 部 : ACQUITY UPLC Waters 製  
MS 部 : Quattro Premier XE Waters 製

#### 2.1.4 定量方法

##### 1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 200 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1500×*g* で 10 分間遠心分離し、上澄み液の一定量をアセトンで正確に 2.5 倍に希釈し、15 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1500×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理 I に供する試料溶液とした。

##### 2) カラム処理 I

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムの下にスルホン酸修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを連結し、メタノール 6 mL 及び水 12 mL で順次洗浄した (吸引マニホールドを使用し、流速 2~3 mL/min とした。以下同じ。)。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液 1 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して、溶出させた。さらに、水 18 mL をミニカラムに加え、同様に溶出させた。溶出液を少量の水で 200 mL のなす形フラスコに移し、誘導体化に供する試料溶液とした。

##### 3) 誘導体化

試料溶液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし、この容器を密栓して 100 °C で 2 時間加熱した後、放冷し、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。酢酸エチル 4 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

##### 4) カラム処理 II

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) の下にシリカゲルミニカラム (690 mg) を連結し、酢酸エチル 10 mL で洗浄した (吸引マニホールドを使用し、流速 2~3 mL/min とした。以下同じ。)。試料溶液 2 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更に、酢酸エチル 18 mL をミニカラムに加え、同様に流出させた。

50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、アセトン 10 mL をミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、GLYP 誘導体及び MPPA 誘導体を溶出させた。次に、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムをはずし、アセトン-水 (19+1) 10 mL をシリカゲルミニカラムに加え、MPPA 誘導体及び GLUF 誘導体を溶出させた。溶出液を 50 °C 以下の

水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。0.01 v/v%ギ酸溶液 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

#### 5) 標準液の誘導体化

検量線作成用農薬混合標準原液 1 mL を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし、なす形フラスコを密栓して 100 °C で 2 時間加熱した後、放冷した。この液を、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。0.01 v/v%ギ酸溶液 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、更に同溶媒で正確に希釈し、1 mL 中に GLYP, GLUF 及び MPPA として 0.3, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 及び 300 ng 相当量を含む標準液を調製した。

#### 6) LC-MS/MS による測定

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

Table 1 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), Agilent Technologies
Mobile phase	0.01 v/v% formic acid aqueous solution – acetonitrile (93:7) (hold for 12 min) → 3 min → (5:95) (hold for 10 min) → 6 min → (93:7) (hold for 8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Ion source temperature	120 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (600 L/h, 400 °C)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Capillary voltage	3.0 kV
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )		
GLYP derivative	254	102	—	22	17
		—	152	22	17
GLUF derivative	252	210	—	26	14
		—	150	26	14
MPPA derivative	181	149	—	21	14
		—	93	21	14

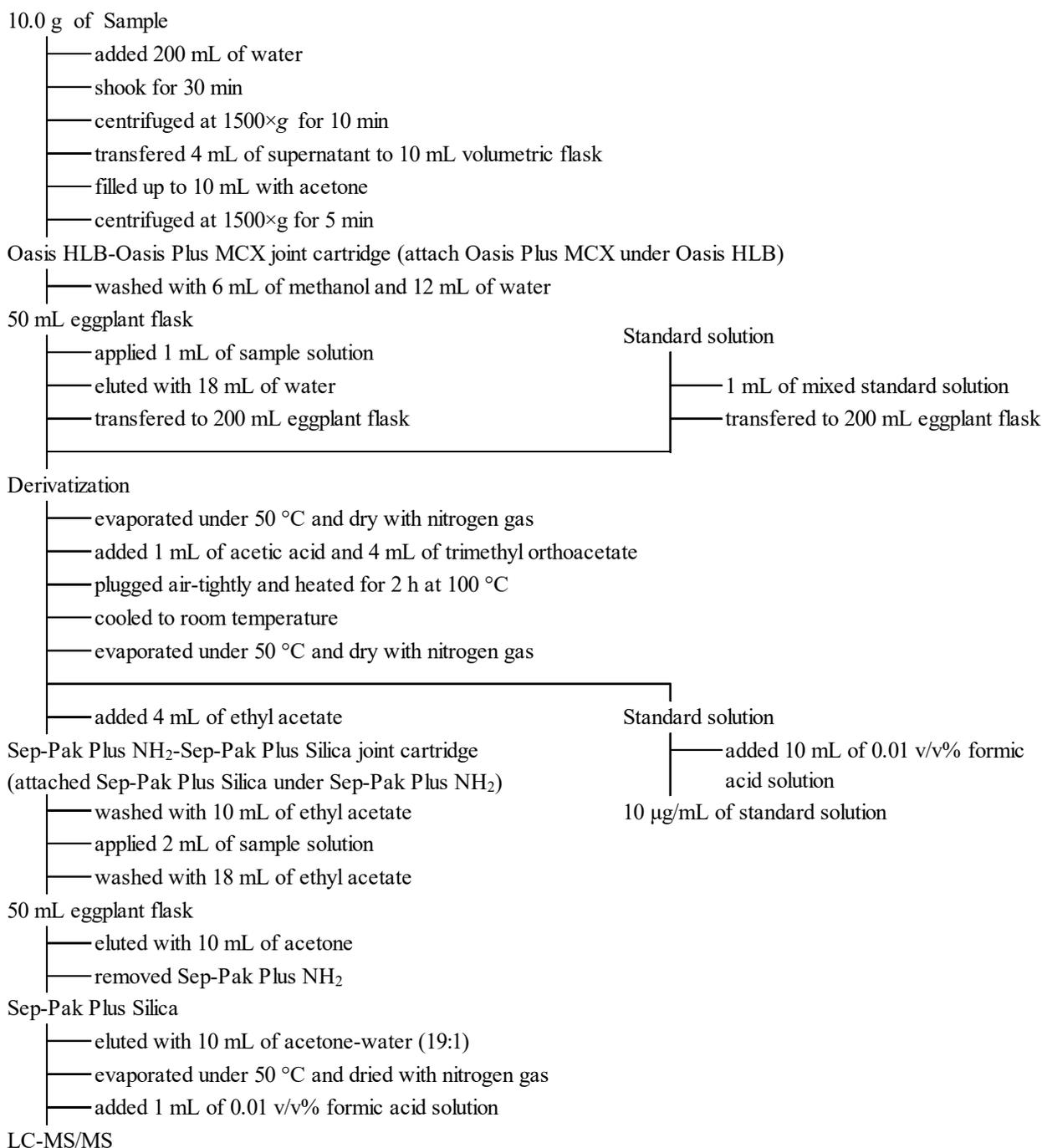
#### 7) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の

GLYP 量 (*N*-アセチルグリホサート由来を含む) , GLUF 量 (*N*-アセチルグルホシネート由来を含む) 及び MPPA 量を算出した.

また, 3)の誘導体化により GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートは GLYP 誘導体に, GLUF 及び *N*-アセチルグルホシネートは GLUF 誘導体にそれぞれなることから, *N*-アセチルグリホサート又は *N*-アセチルグルホシネートを添加して添加回収試験を行った際の回収率 (%) の計算は, 検量線から求めた GLYP 又は GLUF の濃度 (mg/kg) を *N*-アセチルグリホサート又は *N*-アセチルグルホシネートの濃度 (mg/kg) に換算し, 添加した *N*-アセチルグリホサート又は *N*-アセチルグルホシネートの濃度 (mg/kg) で除してその割合を求めることにより行った.

なお, 定量法の概要を Scheme 1 に示した.



Scheme 1 Analytical procedure for GLYP, GLUF, MPPA, *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate in soybean and soybean meal

### 2.1.5 添加回収試験

2.1.2 の 2) ~6) の GLYP 標準原液, GLUF 標準原液, MPPA 標準原液, *N*-アセチルグリホサート標準原液及び *N*-アセチルグルホシネート標準原液を水で正確に希釈し添加に用いた。

大豆, きな粉及び大豆油かすに GLYP として 0.04 及び 20 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GLYP として 0.4 及び 200 ng/mL 相当量), GLUF として 0.05 及び 2 mg/kg 相当量 (同 GLUF として 0.5 及び 20 ng/mL 相当量) 及び MPPA として 0.05 及び 2 mg/kg 相当量 (同 MPPA として 0.5 及び 20 ng/mL 相当量), *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 及び 20 mg/kg 相当量 (同 GLYP と

して 0.32 及び 16 ng/mL 相当量) 及び *N*-アセチルグルホシネートとして 0.05 及び 2 mg/kg 相当量 (同 GLUF として 0.37 及び 1.5 ng/mL 相当量) になるようにそれぞれ添加してよく混合し、一夜静置した後に本法に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

## 2.2 共同試験

### 2.2.1 試料

GLYP, GLUF 及び MPPA を含有しないことを確認した 2 種類の大豆及び 3 種類の大豆油かすをそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。これらの試料及び GLYP, GLUF 及び MPPA が含有しないことを確認した 1 種類のきな粉について約 12 g ずつ小分けしたものの (試料名は非明示) 各 2 袋を試験用試料として計 12 袋を各試験室に配付した。

### 2.2.2 試薬

1) アセトニトリルは LC-MS 用又はこれと同等以上のものを用いた。アセトン、メタノール及び酢酸エチルは残留農薬・PCB 試験用又はこれと同等以上のものを用いた。酢酸及びギ酸は特級又はこれと同等以上のものを用いた。オルト酢酸トリメチルは純度 98 % 以上のものを用いた。水は超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) 又は液体クロマトグラフ用を用いた。

#### 2) GLYP 標準原液

GLYP 標準品 (富士フィルム和光純薬製, 純度 98.9 %) 200 mg を正確に量って 200 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて GLYP 標準原液を調製した (この液 1 mL は、GLYP として 1 mg を含有)。

#### 3) GLUF 標準原液

グルホシネートアンモニウム標準品 (Dr. Ehrenstorfer GmbH 製, 純度 99.04 %) 100 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて GLUF 標準原液を調製した (この液 1 mL は、GLUF として 1 mg を含有)。

#### 4) MPPA 標準原液

MPPA 標準品 (富士フィルム和光純薬製, 純度 99.7 %) 100 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて MPPA 標準原液を調製した (この液 1 mL は、MPPA として 1 mg を含有)。

#### 5) 検量線作成用標準原液

2), 3) 及び 4) で調製した GLYP, GLUF 及び MPPA 各標準原液各 20 mL を 200 mL の全量フラスコに入れて混合し、更に標線まで水を加えて、検量線作成用標準原液を調製した (この液 1 mL は、GLYP, GLUF 及び MPPA として各 100 µg を含有)。

#### 6) GLYP 標準液

2) で調製した GLYP 標準原液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加えて、GLYP 標準液を調製した (この液 1 mL は、GLYP として 100 µg を含有)。

#### 7) 100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液

3) 及び 4) で調製した GLUF 及び MPPA 各標準原液各 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加えて、100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液を調製した (この液 1 mL は、GLUF 及び MPPA として各 100 µg を含有)。

## 8) 10 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液

7)で調製した 100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加えて、10 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液を調製した（この液 1 mL は、GLUF 及び MPPA として各 10 µg を含有）。

## 9) 大豆 1 添加用標準液

6)で調製した GLYP 標準液 2 mL 及び 8)で調製した 10 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に GLYP として 2 µg, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 1 µg を含有する大豆 1 添加用標準液を調製した。

## 10) 大豆 2 添加用標準液

2)で調製した GLYP 標準原液及び 7)で調製した 100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液各 20 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に GLYP として 200 µg, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 20 µg を含有する大豆 2 添加用標準液を調製した。

## 11) きな粉添加用標準液

2)で調製した GLYP 標準原液及び 7)で調製した 100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液各 5 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に GLYP として 50 µg, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 5 µg を含有するきな粉添加用標準液を調製した。

## 12) 大豆油かす 1 添加用標準液

6)で調製した GLYP 標準液 10 mL 及び 8)で調製した 10 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液 20 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に GLYP として 10 µg, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 2 µg を含有する大豆油かす 1 添加用標準液を調製した。

## 13) 大豆油かす 2 添加用標準液

2)で調製した GLYP 標準原液 15 mL を 50 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加えた。この液 40 mL 及び 7)で調製した 100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液 15 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に GLYP として 120 µg, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 15 µg を含有する大豆油かす 2 添加用標準液を調製した。

## 14) 大豆油かす 3 添加用標準液

2)で調製した GLYP 標準原液 30 mL を 50 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加えた。この液 40 mL 及び 7)で調製した 100 µg/mL GLUF, MPPA 混合標準液 25 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線まで水を加え、1 mL 中に GLYP として 240 µg, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 25 µg を含有する大豆油かす 3 添加用標準液を調製した。

5)を 1 本及び 9)~14)を各 2 本、濃度は非通知で 2.2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。なお、1)の試薬については各試験室において準備した。

## 2.2.3 分析試料

2.2.1 の試験用試料を非明示の 2 点反復で用いた。大豆 1 に GLYP として 0.2 mg/kg 相当量、GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.1 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して大豆 1 添加用標準液 1 mL 添加）を、大豆 2 に GLYP として 20 mg/kg 相当量、GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 2 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して大豆 2 添加用標準液 1 mL 添加）を、きな粉に GLYP として 5 mg/kg 相当量、GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.5 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対してきな粉添加用標準液 1 mL 添加）を、大豆油かす 1 に GLYP として 1 mg/kg 相当量、GLUF 及

び MPPA としてそれぞれ 0.2 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して大豆油かす 1 添加用標準液 1 mL 添加）を，大豆油かす 2 に GLYP として 12 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 1.5 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して大豆油かす 2 添加用標準液 1 mL 添加）を，大豆油かす 3 に GLYP として 24 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 2.5 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して大豆油かす 3 添加用標準液 1 mL 添加）を，分析開始の前日に添加して調製した。

#### 2.2.4 定量方法

2.1.4 によった。

#### 2.2.5 報告方法

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

#### 2.2.6 分析実施期間

令和 2 年 12 月 1 日から令和 2 年 12 月 28 日まで

#### 2.2.7 解析方法

結果の解析は，国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>11), 12)</sup>を参考に，平均回収率，繰返し精度（ $RSD_f$ ）及び室間再現精度（ $RSD_R$ ）を算出し，得られた  $RSD_R$  から，修正 Horwitz 式<sup>13)</sup>を用いて HorRat を求めた。

#### 2.2.8 参加試験室

ジューエルサイエンス株式会社，一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所，一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター，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，同名古屋センター及び同神戸センター（計 8 試験室）

### 3 結果及び考察

#### 3.1 分析法開発

##### 3.1.1 大豆抽出液の白濁除去の検討

平成 30 年度の検討において，収載法の大豆への適用を確認したところ，抽出液が白濁し，カラムの目詰まりが生じて以降の操作が行えなかったことから，高橋らの方法<sup>14)</sup>を参考に，抽出液にアセトンを加え，遠心分離することで白濁を除去する方法を検討した。

その結果，0.4~0.8 倍量のアセトンを加えた抽出液は白濁が残ったが，1~1.5 倍量のアセトンを加えた抽出液は白濁がなくなり，カラム処理が可能であった。高橋らの方法では 0.8 倍量のアセトンを加えた抽出液で白濁が除去されているが，収載法では抽出液に 1.5 倍量の水を加えていることから，希釈倍率が同じとなるよう，抽出液に 1.5 倍量のアセトンを加える（2.5 倍希釈）方法が適当であると考えられた。

この方法の目的化合物への影響を確認するため，大豆の抽出液の白濁除去前に各化合物標準液を添加したものと，白濁除去後に各化合物標準液を添加したものの回収率を比較した。その結果，Table 3 のとおり，白濁除去操作を追加しても回収率に問題は認められなかった。

Table 3 Spiked before/after removal of cloudiness

Targets	Spiked level (mg/kg)	Concentration of sample solution (ng/mL)	spike before removal of cloudiness	spike after removal of cloudiness
			recovery <sup>a)</sup> (%)	recovery <sup>a)</sup> (%)
GLYP	20	200	99.2	111
GLUF	2	20	117	121
MPPA	2	20	112	105
<i>N</i> -acetylglyphosate	20	160	106	114
<i>N</i> -acetylglufosinate	2	15	119	120

a)  $n = 1$ 

### 3.1.2 大豆の抽出方法の大豆油かすへの適用の検討

平成 30 年度の検討において、大豆油かすについては、マトリックス効果によるイオン化促進のため、回収率が妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値を満たさなかった。大豆油かすの抽出液の上澄みには濁りはないがアセトンを加えることにより白濁するため、抽出操作による夾雑物の除去として、大豆の抽出方法が大豆油かすに適用可能かを検討した。添加回収試験を実施した結果、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たしたことから、大豆油かすにも大豆の抽出方法を適用することが適当と判断した。

### 3.1.3 妨害物質の検討

大豆 2 検体、きな粉 1 検体及び大豆油かす 3 検体を試料として、2.1.4 により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においても定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

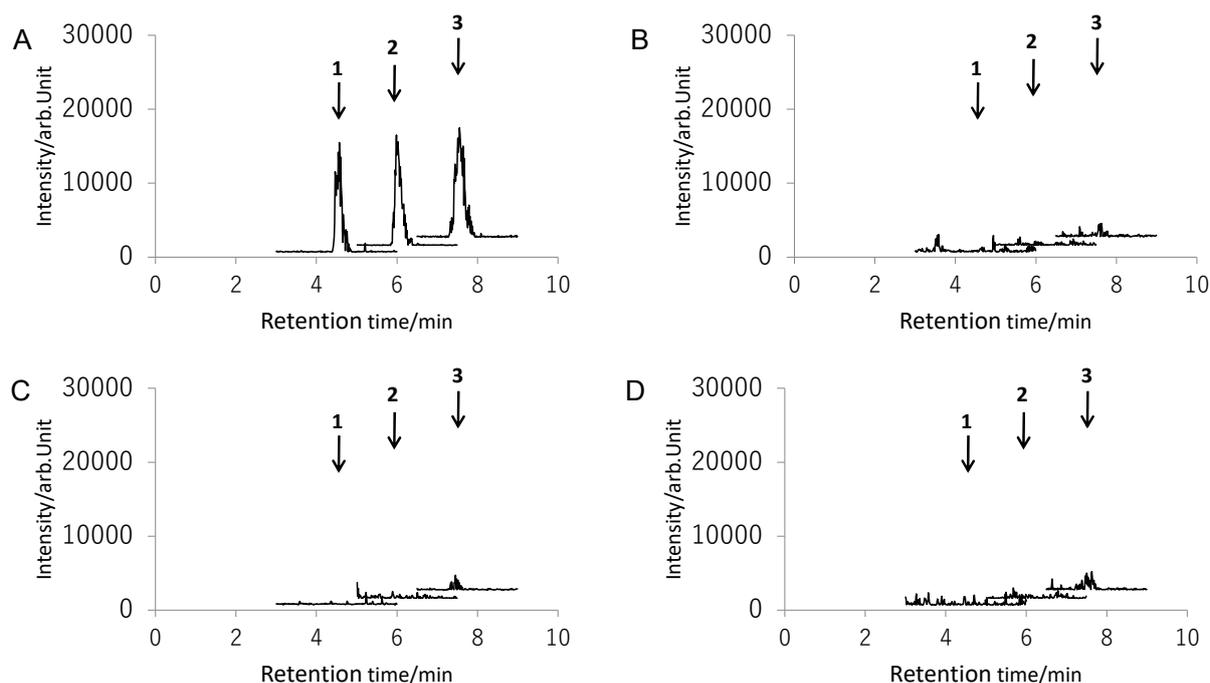


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of 1: GLUF derivative, 2: MPPA derivative and 3: GLYP derivative. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (0.5 ng/mL each)

B~D: Blank sample solution (B: soybean, C: kinako and D: soybean meal)

### 3.1.4 マトリックス効果の確認

2.1.4 の 1)及び 4)により調製した大豆及び大豆油かすのブランク試料溶液に GLYP 誘導体を GLYP として 20 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GLYP として 200 ng/mL 相当量), GLUF 誘導体を GLUF として 2 mg/kg 相当量 (同 GLUF として 20 ng/mL 相当量), MPPA 誘導体を MPPA として 2 mg/kg 相当量 (同 MPPA として 20 ng/mL 相当量) を添加したマトリックス標準液について, 2.1.4 の 5)に従って調製した同濃度の各化合物標準液に対するピーク面積比を確認したところ, Table 4 のとおりであり, 各化合物は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった.

Table 4 Matrix effect study

Targets	Concentration of targets		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)	
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample <sup>a)</sup> (mg/kg)	Soybean	Soybean meal
GLYP derivative	200	20	101	109
GLUF derivative	20	2	111	110
MPPA derivative	20	2	95.4	104

$n = 3$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

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

### 3.1.5 添加回収試験

2.1.5 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 5 のとおり、GLYP について平均回収率は 82.3~115 %，その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 18 %以下，GLUF について平均回収率は 80.9~111 %， $RSD_r$  は 12 %以下，MPPA について平均回収率は 79.1~113 %， $RSD_r$  は 11 %以下，*N*-アセチルグリホサートについて平均回収率は 84.5~110 %， $RSD_r$  は 15 %以下，*N*-アセチルグルホシネートについて平均回収率は 86.0~117 %， $RSD_r$  は 18 %以下の成績が得られ，妥当性確認法ガイドラインに定められた 1)及び 2)の真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

1) 真度：70 %以上 120 %以下

2) 併行精度：22 %以下（添加濃度 0.04 mg/kg 及び 0.05 mg/kg），14 %以下（同 2 mg/kg），10 %以下（同 20 mg/kg）

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 5 Recoveries for GLYP, GLUF, MPPA, *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate

Targets	Spiked level (mg/kg)	Soybean		Kinako		Soybean meal	
		recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)
GLYP	0.04	115	12	85.6	18	95.7	13
	20	109	4.1	82.3	4.1	104	4.6
GLUF	0.05	102	12	102	12	84.8	3.7
	2	111	9.4	80.9	11	111	8.2
MPPA	0.05	107	3.7	94.4	10	79.1	11
	2	111	3.1	90.0	3.7	113	6.0
<i>N</i> -acetylglyphosate	0.04	110	15	89.0	6.9	93.9	11
	20	92.6	4.9	84.5	5.4	104	4.4
<i>N</i> -acetylglufosinate	0.05	92.1	9.0	107	17	86.0	18
	2	111	5.7	88.4	8.1	117	3.3

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

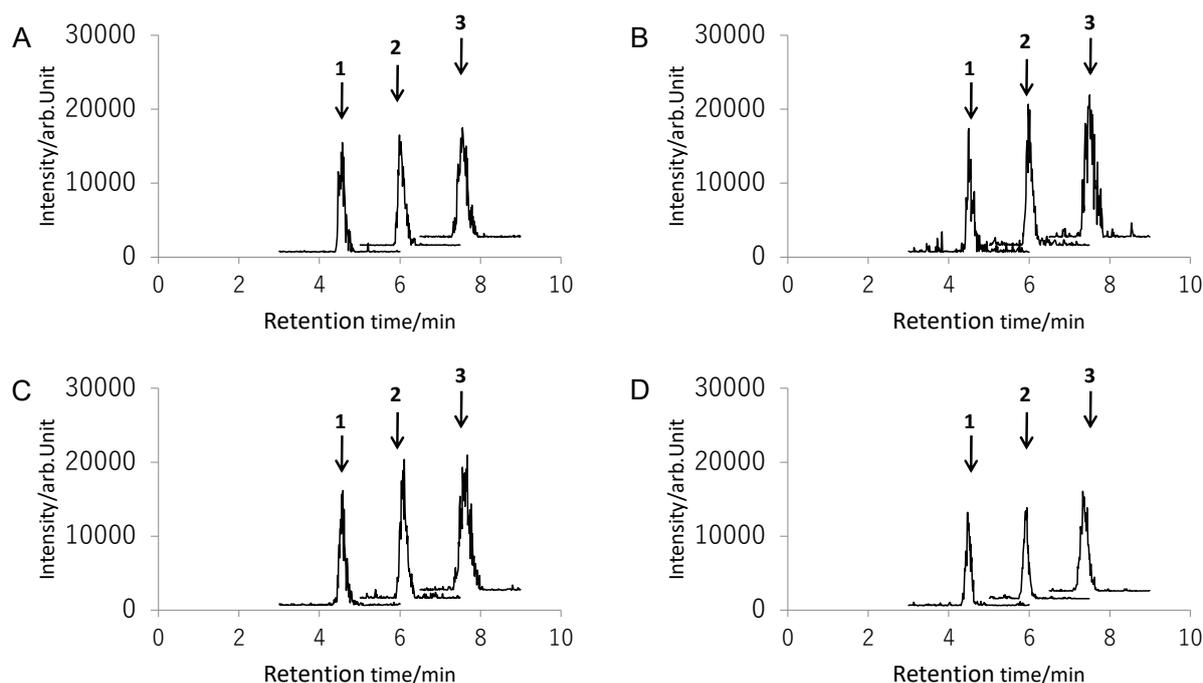


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peaks of 1: GLUF derivative, 2: MPPA derivative and 3: GLYP derivative. The baselines were shifted for display.)

- A: Standard solution (The concentration is 0.5 ng/mL as GLYP, GLUF and MPPA.)  
 B: Sample solution of soybean spiked at 0.04 mg/kg of GLYP (the concentration in the sample solution is about 0.4 ng/mL as GLYP) and 0.05 mg/kg of GLUF and MPPA (the concentration in the sample solution is about 0.5 ng/mL as GLUF and MPPA).  
 C: Sample solution of kinako spiked at 0.04 mg/kg of GLYP (the concentration in the sample solution is about 0.4 ng/mL as GLYP) and 0.05 mg/kg of GLUF and MPPA (the concentration in the sample solution is about 0.5 ng/mL as GLUF and MPPA).  
 D: Sample solution of soybean meal spiked at 0.04 mg/kg of GLYP (the concentration in the sample solution is about 0.4 ng/mL as GLYP) and 0.05 mg/kg of GLUF and MPPA (the concentration in the sample solution is about 0.5 ng/mL as GLUF and MPPA).

### 3.1.6 定量下限及び検出下限

GLYP 誘導体の検量線が直線性を示した範囲、GLYP として 0.3~300 ng/mL の下端付近となる濃度（大豆及び大豆油かすに GLYP として 0.04 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLYP として 0.4 ng/mL 相当量）及び *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 mg/kg 相当量（同 GLYP として 0.32 ng/mL 相当量））の添加回収試験の結果は良好であり（Table 5），得られたピークの *SN* 比が 10 以上であったため、GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートの定量下限は大豆及び大豆油かすで 0.04 mg/kg とした。

GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体の検量線が直線性を示した範囲、GLUF 及び MPPA として 0.3~300 ng/mL の下端付近となる濃度（大豆及び大豆油かすに GLUF, MPPA 及び *N*-アセチルグリホサートとしてそれぞれ 0.05 mg/kg 相当量（同 GLUF として 0.5 ng/mL 相当量, MPPA とし

て 0.5 ng/mL 相当量, GLUF として 0.37 ng/mL 相当量) ) の添加回収試験の結果は良好であり (Table 5), 得られたピークの SN 比が 10 以上であったため, GLUF, MPPA 及び *N*-アセチルグルホシネートの定量下限は大豆及び大豆油かすで 0.05 mg/kg とした.

本法の検出下限を確認するため, 添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた. その結果, 検出下限は大豆及び大豆油かすで GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートとして 0.01 mg/kg, GLUF, MPPA 及び *N*-アセチルグルホシネートとして 0.02 mg/kg であった.

### 3.2 共同試験

開発した分析法の室間再現精度を確認するため, 2.2 により共同試験を実施した.

GLYP の結果は Table 6 のとおりであり, 平均回収率は 84.9~98.3 %,  $RSD_r$  は 8.7~13 %,  $RSD_R$  は 14~17 %, HorRat は 0.76~1.6 であった.

GLUF の結果は Table 7 のとおりであり, 平均回収率は 94.3~105 %,  $RSD_r$  は 6.8~13 %,  $RSD_R$  は 15~23 %, HorRat は 0.77~1.3 であった.

MPPA の結果は Table 8 のとおりであり, 平均回収率は 102~117 %,  $RSD_r$  は 6.2~20 %,  $RSD_R$  は 16~26 %, HorRat は 1.1~1.6 であった.

それぞれの成分ともに, 妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値 (GLYP の大豆 1 については 41 %以下, 大豆 2 については 21 %以下, きな粉については 25 %以下, 大豆油かす 1 については 32 %以下, 大豆油かす 2 については 22 %以下, 大豆油かす 3 については 20 %以下, GLUF の大豆 1 については 44 %以下, 大豆 2 については 29 %以下, きな粉については 35 %以下, 大豆油かす 1 については 41 %以下, 大豆油かす 2 については 30 %以下, 大豆油かす 3 については 28 %以下, MPPA の大豆 1 については 44 %以下, 大豆 2 については 29 %以下, きな粉については 35 %以下, 大豆油かす 1 については 40 %以下, 大豆油かす 2 については 29 %以下, 大豆油かす 3 については 27 %以下) を満たす良好な結果が得られた. HorRat については, 1.5 を超えるものが散見されたが, 本法は精製工程が長いこと, 水の濃縮乾固後もエバポレーターを使用し続けると回収率が下がること, 一般的に誘導体化の工程を含むとばらつきが大きくなることなどの影響のためと考えられた.

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

Table 6 Collaborative study for GLYP

Lab. No.	Soybean 1		Soybean 2		Kinako		Soybean meal 1		Soybean meal 2		Soybean meal 3	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.218	0.210	21.6	20.4	5.86	5.54	1.30	1.32	13.8	14.1	29.1	27.5
2	0.144	0.172	15.2	15.5	3.99	4.84	0.936	0.981	10.5	9.93	20.3	21.0
3	0.162	0.172	17.0	15.2	4.08	4.98	0.929	0.933	10.3	10.8	16.0	20.0
4	0.158	0.161	14.4	14.8	4.38	3.63	0.959	0.739	9.84	10.6	20.2	20.7
5	0.219	0.179	15.8	15.7	4.14	5.05	0.675	1.02	13.0	9.53	22.4	24.9
6	0.161	0.169	18.8	18.9	4.95	4.61	1.06	0.973	12.0	11.2	24.1	24.6
7	0.191	0.202	14.1	16.8	3.67	4.63	0.970	0.877	10.2	9.48	18.5	20.7
8	0.247	0.165	21.1	16.3	5.99	5.21	0.907	1.15	9.49	12.5	18.9	24.6
Spiked level (mg/kg)	0.2		20		5		1		12		24	
No. labs <sup>a)</sup>	8		8		8		8		8		8	
No. outliers <sup>b)</sup>	0		0		0		0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.183		17.0		4.72		0.983		11.1		22.1	
Mean recovery (%)	91.6		84.9		94.4		98.3		92.3		92.1	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	13		8.7		11		13		11		9.0	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	16		15		15		17		14		16	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	21		10		13		16		11		10	
HorRat	0.76		1.4		1.2		1.1		1.3		1.6	

- a) Number of laboratories retained after the outliers were removed  
b) Number of the removed outliers  
c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory  
d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories  
e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 7 Collaborative study for GLUF

Lab. No.	Soybean 1		Soybean 2		Kinako		Soybean meal 1		Soybean meal 2		Soybean meal 3	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.107	0.102	2.14	2.09	0.620	0.560	0.215	0.236	1.59	1.68	2.85	2.85
2	0.0908	0.104	1.98	1.98	0.458	0.574	0.212	0.226	1.54	1.56	2.80	2.63
3	0.0781	0.0633	1.78	1.56	0.420	0.461	0.203	0.203	1.62	1.50	1.81	2.13
4	0.0889	0.0833	1.60	1.55	0.482	0.465	0.212	0.173	1.34	1.36	2.42	2.32
5	0.129	0.123	2.07	2.05	0.533	0.643	0.188	0.232	1.91	1.66	2.86	2.80
6	0.0751	0.0705	1.54	1.54	0.402	0.396	0.160	0.156	1.20	1.28	2.15	2.11
7	0.116	0.113	2.10	2.45	0.650	0.572	0.247	0.228	2.02	1.64	3.23	3.37
8	0.104	0.0607	2.29	1.57	0.649	0.538	0.140	0.216	1.18	1.59	2.05	2.61
Spiked level (mg/kg)	0.1		2		0.5		0.2		1.5		2.5	
No. labs <sup>a)</sup>	8		8		8		8		8		8	
No. outliers <sup>b)</sup>	0		0		0		0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.0943		1.89		0.526		0.203		1.54		2.56	
Mean recovery (%)	94.3		94.7		105		101		103		102	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	13		11		11		12		10		6.8	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	23		16		17		16		15		18	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	22		15		18		20		15		14	
HorRat	1.0		1.1		0.97		0.77		1.0		1.3	

- a) Number of laboratories retained after the outliers were removed  
b) Number of the removed outliers  
c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory  
d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories  
e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 8 Collaborative study for MPPA

Lab. No.	Soybean 1 (mg/kg)		Soybean 2 (mg/kg)		Kinako (mg/kg)		Soybean meal 1 (mg/kg)		Soybean meal 2 (mg/kg)		Soybean meal 3 (mg/kg)	
1	0.161	0.148	2.20	2.18	0.650	0.596	0.265	0.291	2.09	2.06	3.62	3.44
2	0.0870	0.0880	1.92	1.91	0.465	0.541	0.237	0.268	1.92	1.93	3.22	3.16
3	0.0998	0.0908	1.94	1.45	0.413	0.464	0.114	0.124	2.03	1.65	1.79	2.22
4	0.0878	0.0872	1.37	1.49	0.482	0.410	0.190	0.164	1.31	1.38	2.38	2.16
5	0.159	0.138	2.54	2.64	0.720	0.744	0.272	0.254	2.12	2.00	3.28	3.90
6	0.102	0.158	1.97	2.07	0.490	0.474	0.205	0.191	1.51	1.52	2.47	2.49
7	0.124	0.116	2.15	2.04	0.580	0.190	0.232	0.209	1.78	1.68	2.76	2.82
8	0.118	0.0912	2.55	2.15	0.645	0.596	0.165	0.202	1.52	1.65	2.45	2.63
Spiked level (mg/kg)	0.1		2		0.5		0.2		1.5		2.5	
No. labs <sup>a)</sup>	8		8		8		8		8		8	
No. outliers <sup>b)</sup>	0		0		0		0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.116		2.04		0.529		0.211		1.76		2.80	
Mean recovery (%)	116		102		106		106		117		112	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	15		8.2		20		8.2		6.2		7.4	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	25		19		26		26		16		22	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	22		14		18		20		15		14	
HorRat	1.1		1.3		1.5		1.3		1.1		1.6	

- a) Number of laboratories retained after the outliers were removed  
b) Number of the removed outliers  
c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory  
d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories  
e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 9 Instruments used in the collaborative study

Lab.No	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
2	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	LC: Prominence Shimadzu MS/MS: LCMS-8060, Shimadzu	InertSil C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3 µm)
6	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: 4000 QTRAP, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: ExionLC AD, AB SCIEX MS/MS: API-5500 Q TRAP, AB SCIEX	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
8	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro premier XE, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)

#### 4 まとめ

大豆及び大豆油かすに残留する GLYP, GLUF, MPPA, *N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチ

ルグルホシネートについて、収載法を基に、LC-MS/MS を用いた分析法を開発するとともに、共同試験を実施し、飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、抽出液の希釈溶媒を変更することで、以下の結果が得られ、収載が可能であると考えられた。

- 1) 大豆，きな粉及び大豆油かすについて，本法に従って得られたクロマトグラムには選択性を妨げるピークは認められなかった。
- 2) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果，GLYP，GLUF，MPPA，*N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチルグルホシネートは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 3) 大豆，きな粉及び大豆油かすに GLYP として 0.04 及び 20 mg/kg 相当量，GLUF として 0.05 及び 2 mg/kg 相当量，MPPA として 0.05 及び 2 mg/kg 相当量を添加並びに *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 及び 20 mg/kg 相当量及び *N*-アセチルグルホシネートとして 0.05 及び 2 mg/kg 相当量を添加し，本法に従って 5 点併行分析を実施し，回収率及び繰返し精度を求めたところ，妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 4) 本法の GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートの定量下限は 0.04 mg/kg，検出下限は 0.01 mg/kg，GLUF，MPPA 及び *N*-アセチルグルホシネートの定量下限は 0.05 mg/kg，検出下限は 0.01 mg/kg であった。
- 5) 大豆 1 に GLYP として 0.2 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.1 mg/kg 相当量，大豆 2 に GLYP として 20 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 2 mg/kg 相当量，きな粉に GLYP として 5 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.5 mg/kg 相当量，大豆油かす 1 に GLYP として 1 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.2 mg/kg 相当量，大豆油かす 2 に GLYP として 12 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 1.5 mg/kg 相当量，大豆油かす 3 に GLYP として 24 mg/kg 相当量，GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 2.5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 8 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ，妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。

## 謝 辞

共同試験に参加していただいたジーエルサイエンス株式会社，一般財団法人日本食品分析センター一彩都研究所及び一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センターにおける関係者各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会：グリホサート農薬評価書，平成 28 年 7 月 (2016)。
- 2) 食品安全委員会：グルホシネート農薬評価書（第 3 版），平成 25 年 7 月 (2013)。
- 3) 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律，昭和 28 年 4 月 11 日，法律第 35 号 (1953)。
- 4) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976)。
- 5) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988)。

- 6) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 7) 齊木 雅一，廣井 利明：含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の妥当性確認～*N*-アセチルグリホサートの追加並びに大豆及び大豆油かすへの適用拡大～，飼料研究報告，**44**，136-150 (2019).
- 8) 牧野 大作，若宮 洋市，榊原 良成，船木 紀夫：穀類，稲わら及び稲発酵粗飼料中のグリホサートの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法，飼料研究報告，**39**，30-143 (2014).
- 9) 杉本 泰俊，船木 紀夫，榊原 良成：穀類，乾牧草，稲わら及び稲発酵粗飼料中の含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法，飼料研究報告，**40**，71-90 (2015).
- 10) 齊木 雅一，宮野谷 杏：含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の妥当性確認～*N*-アセチルグリホサートの穀類，稲わら及び稲発酵粗飼料への適用～，飼料研究報告，**45**，93-102 (2020).
- 11) Willian Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 12) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 13) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).
- 14) 高橋 邦彦，堀江 正一，青羽 信次：HPLC による農産物中のグリホサート及びその代謝物アミノメチルホスホン酸の分析，*食品衛生学雑誌*，**42**，304-308 (2001).

## 2 稲発酵粗飼料中のデオキシニバレノール及びゼアラレノンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発

鈴木 知華\*

### Development of Determination Method of Deoxynivalenol and Zearalenone in Whole-Crop Rice Silage by LC-MS/MS

SUZUKI Chika\*

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

This paper presents the results of a validation I have conducted for developing a quantitative determination method of the concentration of deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) in whole-crop rice silage (WCRS) using a liquid-chromatograph atmospheric-pressure-chemical-ionization tandem mass spectrometer (LC-APCI-MS/MS).

DON and ZEN were extracted with acetonitrile-water (21:4), and the extracted solution was centrifuged. The supernatant (1 mL) was then diluted with acetonitrile-water (21:4) to a volume of 20 mL. The diluted solution was purified with a SPE column (InertSep VRA-3, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), and the purified solution was used for LC-MS/MS determination of ZEN. As for DON, the purified solution was further purified with graphite carbon to obtain a sample solution. Sample solutions thus obtained from each process of DON and ZEN were respectively injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of DON and ZEN. LC separation was then carried out on an ODS column (InertSustain C18, 3.0 mm i.d. × 50 mm, 2 μm, GL Sciences Inc.) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate aqueous solution and 2 mmol/L ammonium acetate methanol solution for DON; and 2 mmol/L ammonium acetate aqueous solution and acetonitrile for ZEN as a mobile phase respectively. In the MS/MS analysis, the negative mode atmospheric pressure chemical ionization (APCI-) was used.

Recovery tests were conducted on WCRS. WCRS was added with 0.2 and 4 mg/kg of DON, and 0.04 and 1 mg/kg of ZEN respectively. The resulting mean recoveries ranged from 97.9 % to 107 %, and the repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub>) was less than 3.9 % for DON, while the mean recoveries ranged from 100 % to 110 %, and RSD<sub>r</sub> was less than 12 % for ZEN.

Key words: deoxynivalenol; zearalenone; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); atmospheric pressure chemical ionization (APCI); whole-crop rice silage

キーワード：デオキシニバレノール；ゼアラレノン；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；大気圧化学イオン化法；稲発酵粗飼料

## 1 緒 言

飼料自給率の向上は、食料自給率向上の重要な施策として位置付けられ、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）を含む国産粗飼料の増産対策が積極的に行われている。その一方で、飼料作物サイレージからデオキシニバレノール（以下「DON」という。）、ゼアラレノン（以下「ZEN」という。）等のかび毒が検出されており<sup>1)</sup>、農林水産省が委託事業として平成 24 年度から汚染実

\* 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

態調査事業を実施している。飼料分析基準<sup>2)</sup>に記載されている DON 及び ZEN を含むかび毒一斉分析法はとうもろこしサイレージへの適用が困難であることが確認されており<sup>3)</sup>，上記の汚染実態調査事業では，事業者が独自に開発した分析法<sup>4)~8)</sup>が用いられている。

飼料の有害物質の指導基準及び管理基準<sup>9)</sup>において，DON については反すう動物（ほ乳期のものを除く．）に給与される飼料中で 4 mg/kg 並びに家畜（反すう動物（ほ乳期のものを除く．）を除く．）及び家きんに給与される飼料中で 1 mg/kg，ZEN については家畜及び家きんに給与される飼料中で 1 mg/kg の管理基準値が設定されており，将来的に国産粗飼料が管理基準値を遵守していることを確認するための分析法を定めておく必要があると考えられる。

このため，令和元年度に大島らは，汚染実態調査事業において平成 29 年度に一般財団法人日本食品検査が用いた分析法<sup>10)</sup>及び平成 30 年度に一般社団法人日本海事検定協会が用いた分析法<sup>11)</sup>を基に，とうもろこしサイレージ中の DON 及び ZEN の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の飼料分析基準への掲載の可否を検討した<sup>12)</sup>。この分析法について，適用範囲を WCRS に拡大するための検討を行ったので，その概要を報告する。

参考に DON 及び ZEN の構造式等を Fig. 1 に示した。

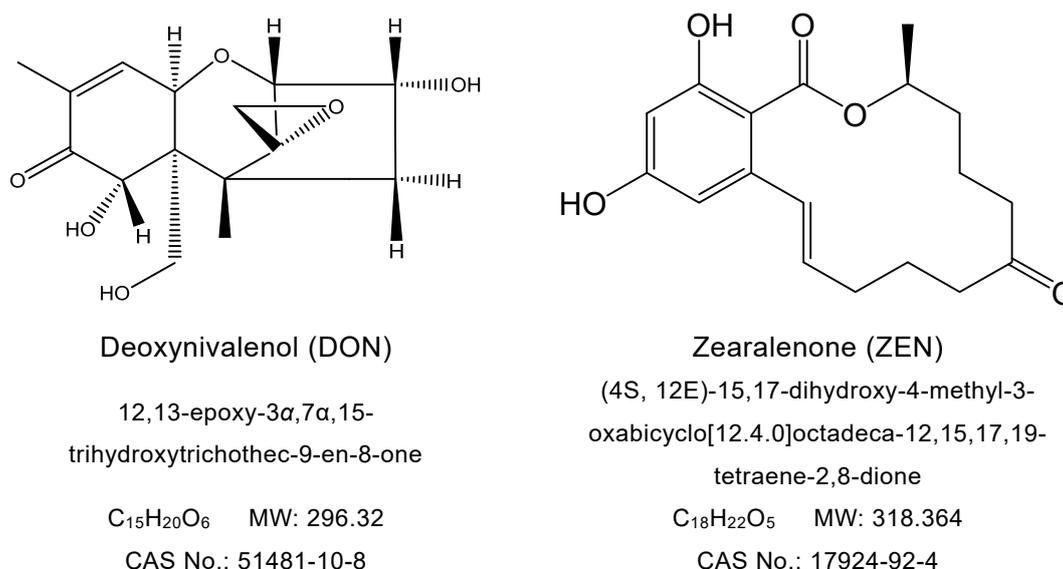


Fig. 1 Chemical structures of DON and ZEN

## 2 実験方法

### 2.1 試料

WCRS は，60 °C で 18~24 時間乾燥後，更に室内に静置して風乾した後，はさみを用いて細断したのち目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し，分析用試料とした。

### 2.2 試薬

- 1) アセトニトリル及びメタノールは LC-MS 用（富士フイルム和光純薬製），グラファイトカーボン は Supelclean ENVI-Carb SPE Bulk Packing（Sigma-Aldrich 製），1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

## 2) DON 標準液

DON 標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 100.0 %）2 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリルを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えて DON 標準原液を調製した（この液 1 mL は，DON として 0.1 mg を含有）。

使用に際して，DON 標準原液 1 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ，更に標線までアセトニトリル-水（21+4）を加えて，1 mL 中に DON として 2 µg を含有する標準液を調製した。この標準液の一定量を，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 としてそれぞれ 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng を含有する各標準液を調製した。

## 3) ZEN 標準液

ZEN 標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 100.0 %）2 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリルを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えて ZEN 標準原液を調製した（この液 1 mL は，ZEN として 0.1 mg を含有）。

使用に際して，ZEN 標準原液 1 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ，更に標線までアセトニトリル-水（21+4）を加えて，1 mL 中に ZEN として 2 µg を含有する標準液を調製した。この標準液の一定量を，アセトニトリル-水（21+4）で正確に希釈し，1 mL 中に ZEN としてそれぞれ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 及び 50 ng を含有する各標準液を調製した。

## 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機：ストロングシェイカーSR-2DW タイテック製（使用時振とう数 300 rpm）
- 3) 多機能カラム：InertSep VRA-3（リザーバー容量 6 mL）ジーエルサイエンス製
- 4) メンブランフィルター：13HP020AN（孔径 0.20 µm，直径 13 mm，ポリテトラフルオロエチレン）東洋濾紙製
- 5) LC-MS/MS：  
LC 部：Nexera X2 島津製作所製  
MS 部：LCMS-8040 島津製作所製

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

分析試料 25.0 g を量って 500 mL の共栓三角フラスコに入れ，アセトニトリル-水（21+4）250 mL を加え，60 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ，1600×g で 5 分間遠心分離し，上澄み液 1 mL を 20 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（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 1 mL を捨てた。10 mL の試験管をカラムの下に置き，その後の流出液 1 mL を受け，LC-MS/MS による ZEN の測定に供する試料溶液とした。更に，別の 10 mL の試験管をカラムの下に置き，その後の流出液 3 mL を受け，精製に供する試料溶液とした。

3) 精製

試料溶液をあらかじめグラファイトカーボン 200 mg を入れた 15 mL の遠心チューブに入れ、1 分間振り混ぜた。1600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液 2 mL を 10 mL の試験管に正確に入れ、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) 0.5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルターでろ過し、LC-MS/MS による DON の測定に供する試料溶液とした。

4) LC-MS/MS による測定

試料溶液、各 DON 標準液及び各 ZEN 標準液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (以下「SRM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 及び Table 2 に示した。液体クロマトグラフ部において、DON 及び ZEN の溶離液の条件を変え、Table 1 のとおりそれぞれ溶離液 1 及び 2 の条件で測定した。

Table 1 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	InertSustain C18 (3.0 mm i.d. × 50 mm, 2 µm), GL Sciences
Mobile phase 1 (DON)	2 mmol/L ammonium acetate aqueous solution-2 mmol/L ammonium acetate methanol solution (19:1) (hold for 1 min) → 9 min → (1:19) (hold for 5.5 min) → 0.1 min → (19:1) (hold for 4.4 min)
Mobile phase 2 (ZEN)	2 mmol/L ammonium acetate aqueous solution-acetonitrile (7:3) (hold for 1 min) → 4 min → (1:19) (hold for 7 min) → 0.1 min → (7:3) (hold for 4.9 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	Air (DON 2.5 L/min, ZEN 4 L/min)
Drying gas	N <sub>2</sub> (DON 6 L/min, ZEN 5 L/min)
Interface temperature	DON 400 °C, ZEN 350 °C
Heat block temperature	200 °C
Desolvation line temperature	250 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

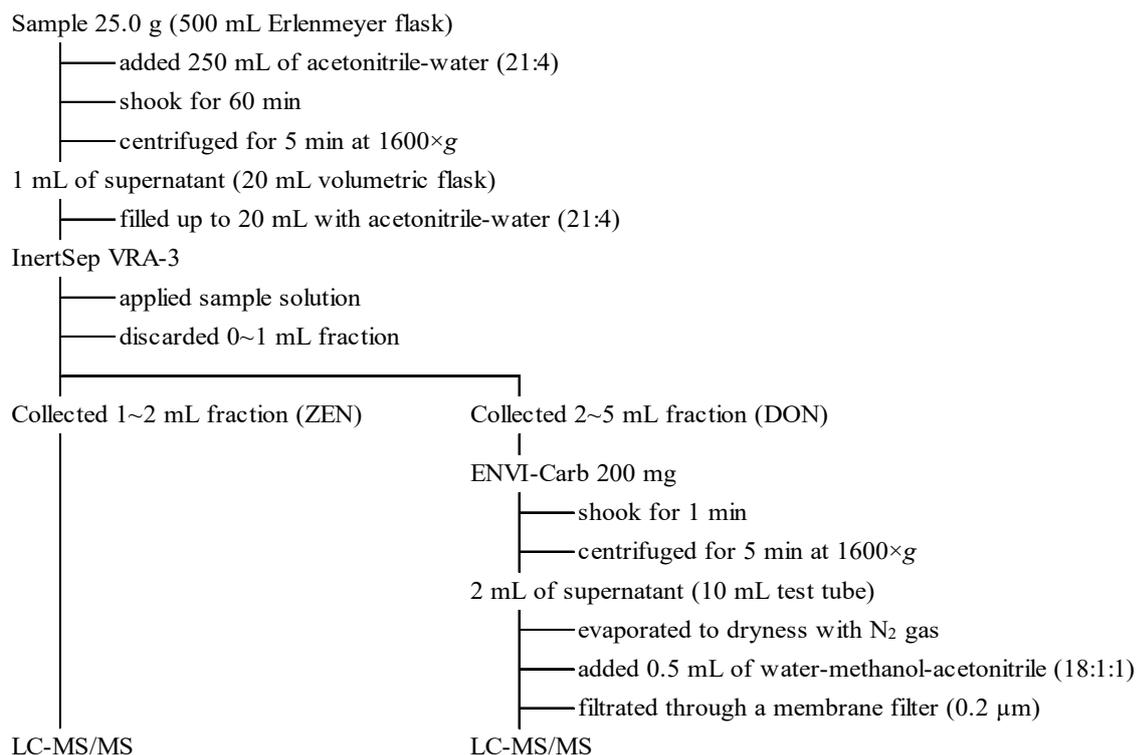
Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )	
DON	295	265	-	11
	355	-	265	15
ZEN	317	131	-	29
		-	175	23

5) 計算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の DON 量及び ZEN 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 DON and ZEN in WCRS

## 2.5 添加回収試験

DON は、DON 標準品（富士フィルム和光純薬製、純度 100.0 %）9 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて DON 添加用標準液を調製した（この液 1 mL は、DON として 0.45 mg を含有）。同標準液をアセトニトリルで正確に希釈し添加した。

ZEN は、2.2 の 2) の ZEN 標準原液をアセトニトリルで正確に希釈し添加した。

WCRS について、DON として、原物換算して 0.2 及び 4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 8 及び 180 ng/mL）、ZEN として、原物換算して 0.04 及び 1 mg/kg 相当量（同 0.4 及び 10 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、添加は風乾物試料に対して DON として 0.4 及び 9 mg/kg 相当量、ZEN として 0.08 及び 2 mg/kg 相当量になるように行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して、原物（水分含有量 60 %）中濃度 = 風乾物（水分含有量 10 %）中濃度 / 2.25 の式により行った。また DON として 9 mg/kg 相当量添加した場合、最終試料溶液中濃度が検量線の最高濃度（100 ng/mL）を超えるため、水-メタノール-アセトニトリル（18+1+1）で 3 倍希釈し測定した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 妨害物質の検討

WCRS 2 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認した結果、定量を妨げるピークは認められなかった。

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

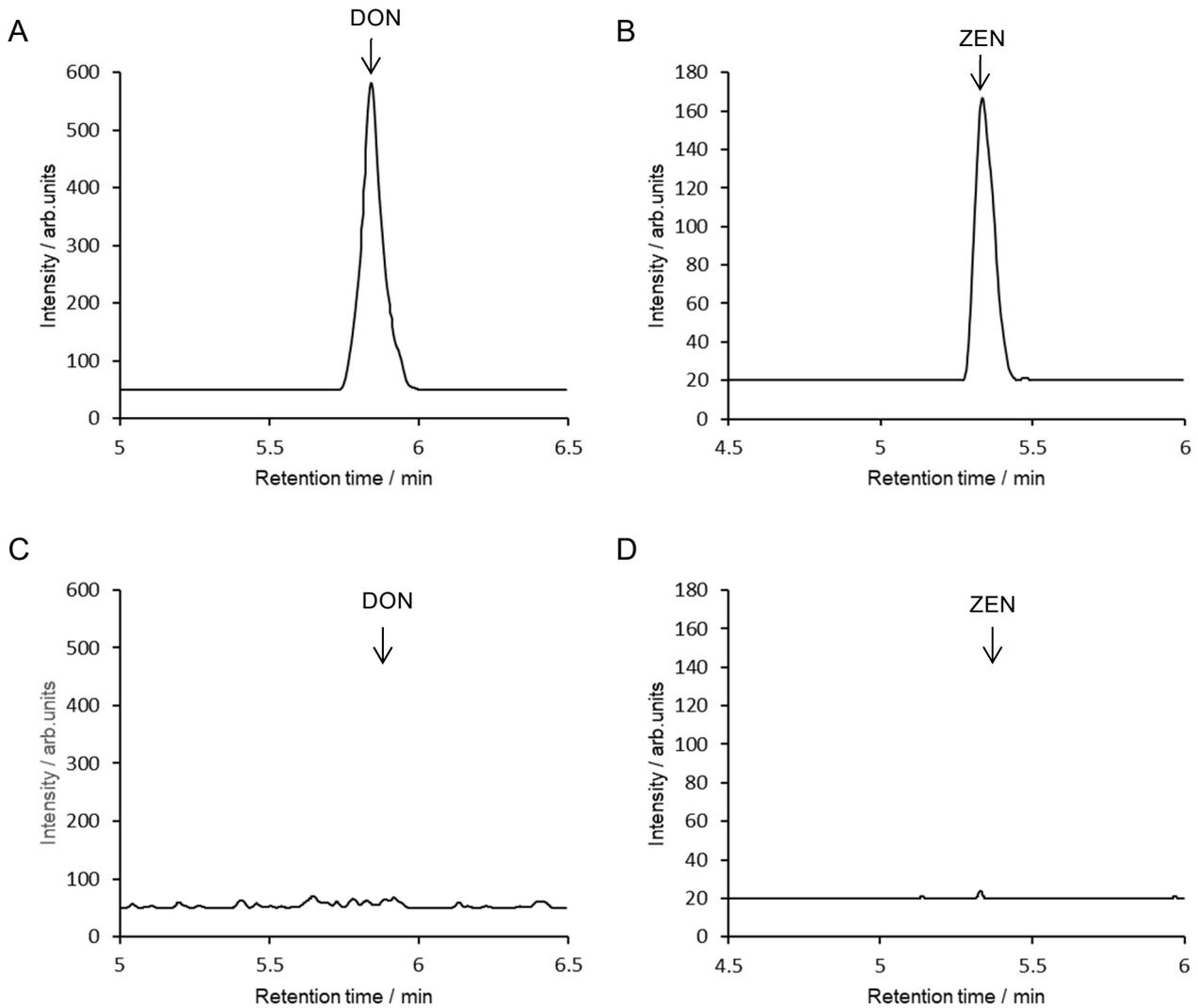


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of DON and ZEN in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of mycotoxins.)

- A: Standard solution (8 ng/mL as DON)
- B: Standard solution (0.4 ng/mL as ZEN)
- C: Sample solution of DON from WCRS (blank)
- D: Sample solution of ZEN from WCRS (blank)

### 3.2 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)~3)により調製した WCRS のブランク試料溶液に DON として 4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 80 ng/mL 相当量）を添加したマトリックス標準液、2.4 の 1)~2)により調製した WCRS のブランク試料溶液に ZEN として 2 mg/kg 相当量（同 10 ng/mL 相当量）を添加したマトリックス標準液について、2.2 の 2)及び 3)に従って調製した同濃度の各かび毒標準液に対するピーク面

積比を確認したところ、Table 2 のとおりであり、各かび毒は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

Table 2 Matrix effect study

Mycotoxins	Concentration of mycotoxins		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)	
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample <sup>a)</sup> (mg/kg air-dry basis)	WCRS 1	WCRS 2
DON	80	4	102	97.1
ZEN	10	2	106	111

$n = 3$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

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

### 3.3 添加回収試験

2.5 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 3 のとおり、DON については平均回収率 97.9~107 %，その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 3.9 %以下，ZEN については平均回収率 100~110 %， $RSD_r$ はとして 12 %以下の成績が得られ，飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度及び併行精度の目標値（真度：70 %以上 120 %以下，精度：0.04 mg/kg では 22 %以下，0.2 mg/kg では 20 %以下，1 mg/kg では 16 %以下，4 mg/kg では 13 %以下）を満たす良好な結果であった。

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig.3 に示した。

Table 3 Recoveries for DON and ZEN

Mycotoxin	Spiked level (mg/kg as fed basis) <sup>a)</sup>	WCRS 1		WCRS 2	
		Recovery <sup>b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)
DON	0.2	105	3.9	107	1.8
	4	97.9	2.8	98.0	2.6
ZEN	0.04	100	12	107	9.9
	1	108	2.7	110	4.2

a) The mycotoxins were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.4 and 9 mg/kg as air-dry basis for DON and 0.08 and 2 mg/kg as air-dry basis for ZEN respectively. The levels of mycotoxins as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

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

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

b) Mean ( $n = 5$ )

c) Relative standard deviation of repeatability

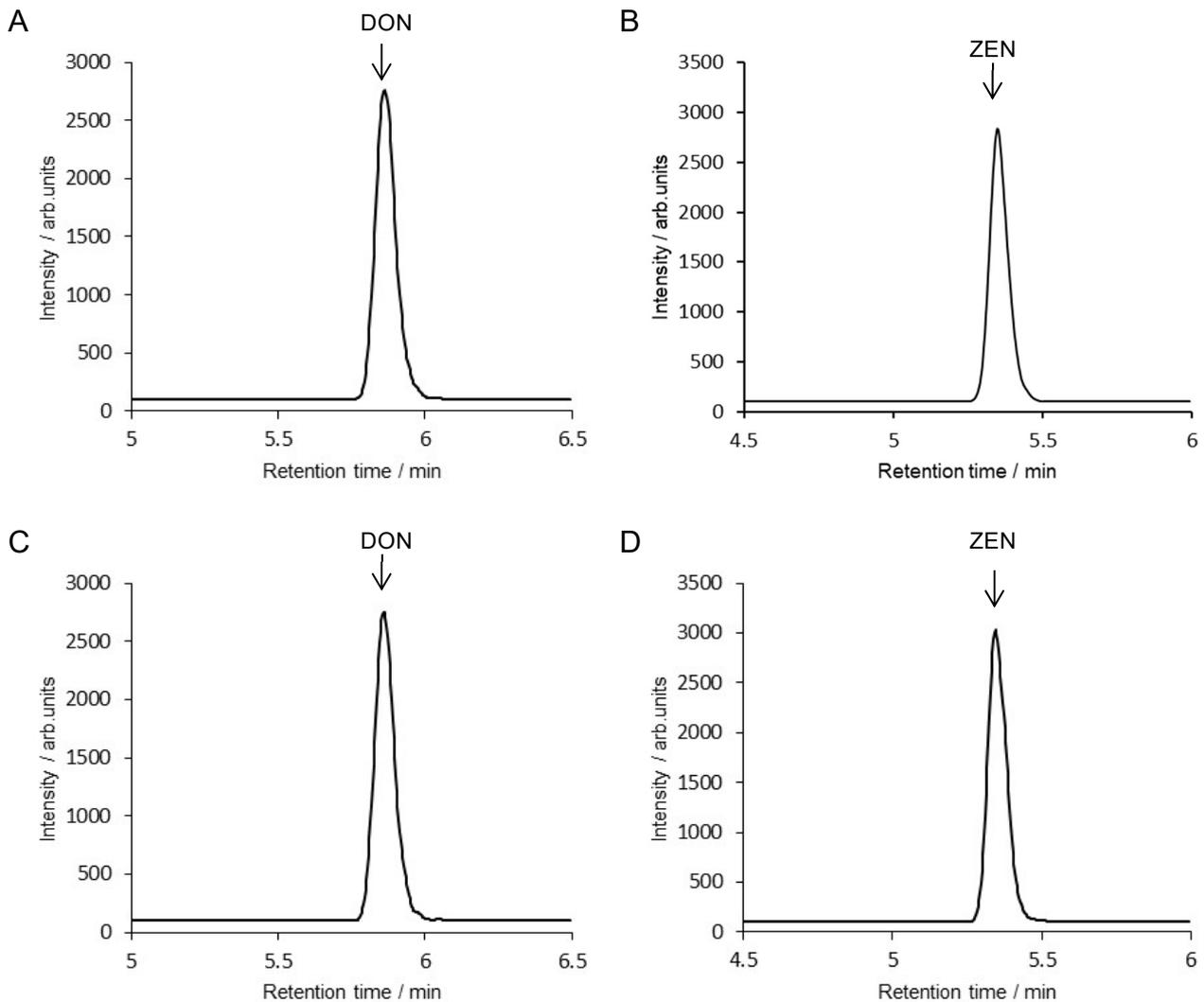


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of DON and ZEN in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peaks of mycotoxin.)

A: Standard solution (60 ng/mL of DON (0.3 ng as injection amount))

B: Standard solution (10 ng/mL of ZEN (0.05 ng as injection amount))

C: Sample solution of WCRS (spiked at 1.3 mg/kg as fed basis of DON (0.3 ng as injection amount))

D: Sample solution of WCRS (spiked at 1 mg/kg as fed basis of ZEN (0.05 ng as injection amount))

### 3.4 定量下限及び検出下限

検量線が直線性を示した範囲，DON においては 4~100 ng/mL の下端付近となる濃度（WCRS 風乾物中で 0.4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中濃度 8 ng/mL 相当量），ZEN においては 0.1~50 ng/mL の下端付近となる濃度（WCRS 風乾物中で 0.08 mg/kg 相当量（最終試料液中濃度 0.4 ng/mL 相当量））の添加回収試験の結果は良好であり，得られたピークの SN 比が 10 以上であったため，DON 及び ZEN の定量下限の濃度は WCRS の風乾物中でそれぞれ 0.4 及び 0.08 mg/kg とした。この濃度は，DON 及び ZEN の WCRS 中の管理基準値（DON については最も低い値）の風乾物中換算値（2 mg/kg）に対してそれぞれ 1/5 及び 1/25 であり，妥当性確認法ガイドラインに

定められた目標値（基準値の 1/5 以下）を満たしていた。

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた。その結果、検出下限は風乾物中で DON 0.1 mg/kg, ZEN 0.04 mg/kg であり、同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（基準値の 1/10 以下）を満たしていた。

#### 4 まとめ

WCRS 中の DON 及び ZEN について、前報を基に、LC-MS/MS を用いた分析法の飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 本検討で用いた WCRS について、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 2) 本法に従い得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、DON 及び ZEN は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 3) WCRS に、DON として原物換算して 0.2 及び 4 mg/kg 相当量、ZEN として原物換算して 0.04 及び 1 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 4) 本法の DON の定量下限は風乾物中で 0.4 mg/kg, 検出下限は 0.1 mg/kg, ZEN の定量下限は風乾物中で 0.08 mg/kg, 検出下限は 0.04 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

#### 文 献

- 1) 平岡 久明：飼料中のマイコトキシン汚染状況，臨床獣医，25(6)，10-17 (2007)。
- 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) 伊藤 千晶，佐藤 憲大：とうもろこしサイレージ中のかび毒定量法に関する検討～アフラトキシン B<sub>1</sub>，ゼアラレノン及びデオキシニバレノール～，飼料研究報告，42，87-100 (2017)。
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成 24 年度飼料中の有害物質等の含有量実態調査事業（重金属，かび毒）報告書，平成 25 年 3 月 (2013)。
- 5) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 25 年度飼料中の有害物質等の含有量実態調査事業（重金属，かび毒）報告書，平成 26 年 3 月 (2014)。
- 6) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 26 年度飼料中のかび毒含有量実態調査事業実態調査報告書，平成 27 年 3 月 (2015)。
- 7) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 27 年度生産資材安全確保対策事業「国産飼料中のかび毒含有実態調査委託事業」報告書，平成 28 年 3 月 (2016)。
- 8) 一般財団法人日本冷凍食品検査協会：平成 28 年度生産資材安全確保対策事業「国産飼料中のかび毒含有実態調査委託事業」報告書，平成 29 年 2 月 (2017)。
- 9) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988)。

- 10) 一般財団法人日本食品検査：平成 29 年度生産資材安全確保対策事業（国産飼料中のかび毒含有実態調査）報告書，平成 30 年 1 月 (2018).
- 11) 一般社団法人日本海事検定協会：平成 30 年度生産資材安全確保対策事業（国産飼料中のかび毒含有実態調査）成果報告書，平成 31 年 1 月 (2019).
- 12) 大島 慎司，田端 麻里，青山 幸二：どうもろこしサイレージ中のデオキシニバレノール及びゼアラレノンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発，飼料研究報告，45, 39-50 (2020).

### 3 脱脂粉乳中のシアヌル酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発

沼田 歩美<sup>\*1</sup>, 大島 慎司<sup>\*2</sup>, 高橋 雄一<sup>\*2</sup>

#### Development of Determination Method of Cyanuric Acid in Dried Skim Milk by LC-MS/MS

NUMATA Ayumi<sup>\*1</sup>, OSHIMA Shinji<sup>\*2</sup> and TAKAHASHI Yuichi<sup>\*2</sup>

(<sup>\*1</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)  
(Now Animal Quarantine Service, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan),

<sup>\*2</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have studied a quantitative determination method of the cyanuric acid concentration in dried skim milk using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Having added water to a sample, it was sonicated. Then, cyanuric acid in the sample was extracted with acetonitrile, and the extracted solution was centrifuged. The supernatant (2 mL) was then diluted with acetonitrile-water (1:1) to a volume of 10 mL. The diluted solution was applied to strong anion exchange mini-column (Oasis MAX, Waters Co.; Milford, MA, USA), which was then rinsed with ammonia water (5:23) and acetonitrile. The purified solution was subsequently injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of cyanuric acid.

LC separation was then carried out on a hydrophilic interaction chromatography column (SeQuant ZIC-HILIC, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Merck Millipore Inc.; Burlington, MA, USA) with a gradient of acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate solution (19:1) and 10 mmol/L ammonium acetate dissolved in acetonitrile-water (1:1) as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the negative mode electrospray ionization (ESI<sup>-</sup>) was used.

Recovery tests were conducted on two kinds of dried skim milk. Cyanuric acid was intentionally added at the levels of 0.5 mg/kg and 2.5 mg/kg to samples respectively. The resulting mean recoveries ranged from 89.3 % to 108 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub>) was less than 9.6 %.

In order to verify whether this method can be applied to feeds other than dried skim milk, recovery tests were conducted on two kinds of formula feed, soybean meal and fish meal. Cyanuric acid was intentionally added at the levels of 0.5 mg/kg and 2.5 mg/kg to samples respectively. The resulting mean recoveries ranged from 89.9 % to 99.0 %. The RSD<sub>r</sub> was less than 16 %.

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

キーワード：シアヌル酸；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；脱脂粉乳

## 1 緒 言

シアヌル酸は、一般にプラスチックに添加する難燃剤や消毒剤の原料、プールの塩素安定剤とし

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

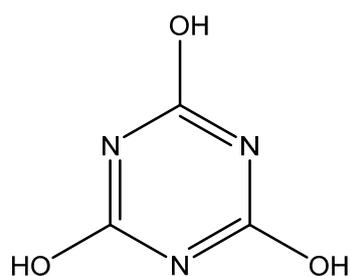
<sup>\*2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

て使用されている<sup>1)</sup>。シアヌル酸及び類似化合物であるメラミンは、安価で入手が容易であり、窒素原子を多く含んでいるため、食品等に添加され、見かけのたん白質含量を高める欺瞞剤として用いられた事例があった<sup>1)</sup>。シアヌル酸及びメラミンは、単独で摂取した場合の急性毒性は比較的低いが、同時に摂取した場合、腎不全を誘発する結晶を形成することが示唆されている<sup>1)</sup>。2007年に米国において、メラミン関連化合物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た。また中国においては、メラミン関連化合物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<sup>2)</sup>。日本において、令和元年8月6日付けで飼料の有害物質の指導基準及び管理基準<sup>3)</sup>が改正され、尿素を除く飼料（飼料原料を含む。）中のメラミン及びシアヌル酸（イソシアヌル酸）として管理基準値が2.5 mg/kgと設定された。改正後の管理基準は令和2年2月6日から適用されているが、シアヌル酸については、その分析法が飼料分析基準<sup>4)</sup>に記載されていないことから、分析法の確立が急務となっている。

このため、平成30年度に長久保らは、米国食品医薬品局（FDA）から示されている液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による分析法<sup>5)</sup>を基に、飼料中のシアヌル酸のLC-MS/MSによる分析法を開発した<sup>6)</sup>。その際、脱脂粉乳について、飼料分析基準別表3の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた併行精度を満たさない結果となり、また内標準である安定同位体元素標識シアヌル酸（以下「シアヌル酸-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>」という。）の回収率も低い結果であった。

そこで、令和元年度に著者らは、脱脂粉乳中のシアヌル酸の分析法の改良について検討を行ったが、カラム処理の検討において、シアヌル酸とシアヌル酸-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>の回収率が乖離する結果となった<sup>7)</sup>。このことは本来であれば起こりえない現象であることから、今回、令和元年度に得られた結果を精査し、引き続き分析法の改良を検討したので、その概要を報告する。また、改良した分析法が脱脂粉乳以外の試料においても適用可能であるか検討したので、合わせて報告する。

参考にシアヌル酸の構造式等を Fig. 1 に示した。



1,3,5-triazinane-2,4,6-trione

C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> MW: 129.075 CAS No.: 108-80-5

Fig. 1 Chemical structure of cyanuric acid

## 2 実験方法

### 2.1 試料

配合飼料（成鶏飼育用、幼すう育成用、ほ乳期子豚育成用、種豚飼育用、ぶり類育成用及びこい育成用）、魚粉、イカミール、エビミール及び大豆油かすは、それぞれ目開き1 mmのスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し、分析用試料とした。脱脂粉乳は、1 mmのふるいを通したも

のを分析用試料として用いた。

魚粉 2 点はマレーシア産及びタイ産を用いた。エビミール 2 点はマレーシア産及びエクアドル産を用いた。イカミール 2 点の産地は不明であった。脱脂粉乳 4 点のうち 1 点はアメリカ産を用いた。その他の試料は国産を用いた。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layers	Grains	55	Corn, rice, wheat
	Oil seed meal	26	Soybean meal, corn germ meal, rapeseed meal, corn gluten meal, sesame meal, linseed meal
	Brans	3	Rice bran, corn gluten feed
	Animal by-products	2	Fish meal
	Others	14	Calcium carbonate, animal fat, corn steep liquor, calcium phosphate, salt, paprika extract, silicate anhydride, fructo-oligo saccharide syrup, rapeseed oil foots, feed additives
For starting chicks	Grains	61	Corn, milo
	Oil seed meal	30	Soybean meal
	Animal by-products	3	Fish meal, swine and poultry by-product meal
	Brans	2	Defatted rice bran, wheat bran, corn gluten feed
	Others	4	Calcium phosphate, calcium carbonate, salt, isomalto-oligo saccharide syrup, animal fat, alfalfa meal, feed additives
For suckling pigs	Animal by-products	46	Dried skim milk, dried whey, fish meal, plasma protein, casein
	Grains	30	Bread crumb, soy by extruder, wheat flour
	Oil seed meal	3	Fermented soybean meal, concentrated soy protein
	Brans	1	Defatted rice bran
	Others	20	Glucose, lactose, animal fat, medium chain fatty acid calcium, salt, lactic acid bacterium, sucrose, cellulose, citric acid, lactic acid, tartrate, malic acid, wood fiber, silicate anhydride, fructo-oligo saccharide syrup, montmorillonite, lactic acid bacteria culture, yeast extract, licorice extract, stevia, yeast, shellac, dry yeast cell wall, calcium carbonate, calcium phosphate, vegetable oil, chocolate, feed additives
For breeding pigs	Grains	64	Corn, milo
	Oil seed meal	20	Soybean meal, rapeseed meal, corn germ meal
	Brans	10	Wheat bran, corn gluten feed, defatted rice bran
	Others	6	Extracted green tea meal, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, montmorillonite, yeast, corn steep liquor, confectionery meal, feed additives
For yellowtail fishes	Animal by-products	53	Fish meal, shrimp meal
	Grains	15	Starch, flour
	Brans	6	Lysine fermented lees meal, glutamic acid fermented lees meal
	Others	26	Fish oil, vegetable oil, yeast, calcium phosphate, garlic powder, seaweed powder, marigold extract, cacao bean husk, feed additives
For carps	Animal by-products	33	Fish meal
	Grains	31	Wheat bran, sesame, heat treated soybean meal, dextrin
	Brans	18	Defatted rice bran
	Oil seed meal	11	Soybean meal
	Others	7	Calcium phosphate, fish oil, vegetable oil, calcium carbonate, feed additives

## 2.2 試薬

- 1) アセトニトリルは LC-MS 用, アンモニア水は特級 (質量分率 28%), ギ酸は LC-MS 用 (質量分率 99%), 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用を用いた (いずれも富士フイルム和光純薬製). 水は Milli-Q Integral 5 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた.
- 2) シアヌル酸標準原液  
シアヌル酸標準品 (ChromaDex, Inc 製, 純度 99.2%) 10 mg を正確に量って 20 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シアヌル酸標準原液を調製した (この液 1 mL は, シアヌル酸として 500  $\mu\text{g}$  を含有).
- 3) シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  内標準原液  
シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  標準品 (林純薬工業製, 純度  $^{13}\text{C}_3$  97.7%) 5 mg を正確に量って 20 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シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  内標準原液を調製した (この液 1 mL は, シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  として 250  $\mu\text{g}$  を含有).
- 4) 検量線作成用シアヌル酸標準液  
使用に際して, シアヌル酸標準原液及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  内標準原液を超音波処理した後, それぞれの一定量をギ酸-アセトニトリル (1+24) で正確に希釈し, 1 mL 中にシアヌル酸として 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 及び 200 ng を含有し, かつシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  として 10 ng を含有する各検量線作成用シアヌル酸標準液を調製した (用時調製).
- 5) シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  内標準液  
使用に際して, シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  内標準原液を超音波処理した後, 一定量を水で正確に希釈し, 1 mL 中にシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  として 4  $\mu\text{g}$  を含有する内標準液を調製した (用時調製).
- 6) 溶離液 A アセトニトリル-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (19+1)
- 7) 溶離液 B 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 10 mL にアセトニトリル-水 (1+1) を加えて 1 L とした.

## 2.3 装置及び器具

- 1) 超音波洗浄機: MCS-6 アズワン販売
- 2) ホモジナイザー: POLYTRON PT20SK KINEMATICA 製
- 3) 強塩基性陰イオン交換体ミニカラム (以下「ミニカラム」という.): Oasis MAX (充てん剤量 150 mg, リザーバー容量 6 mL, 粒径 60  $\mu\text{m}$ ) Waters 製
- 4) メンブランフィルター: 13HP045AN (孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , 直径 13 mm, ポリテトラフルオロエチレン) 東洋濾紙製
- 5) LC-MS/MS:  
LC 部: Nexera X2 島津製作所製  
MS 部: LCMS-8040 島津製作所製

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

分析試料 1 g を正確に量って 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ, 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, 更にシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  内標準液 250  $\mu\text{L}$  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

1600×g で 10 分間遠心分離し，上澄み液 2 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

ミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及びアンモニア水 (5+23) 5 mL で順次洗浄した．試料溶液 2 mL をあらかじめアンモニア水 (5+23) 3 mL を入れたミニカラムに加えて混和した後，液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた．さらに，アンモニア水 (5+23) 5 mL をミニカラムに加えて流出させた後，アセトニトリル 5 mL をミニカラムに加えて全量を流出させた（流速は 1~2 mL/min 程度となるように吸引マニホールドを使用した．以下同様．）．

10 mL の共栓試験管をミニカラムの下に置き，ギ酸-アセトニトリル (1+24) 2 mL をミニカラムに正確に加えてシアヌル酸を溶出させた後，全量を流出させた．

溶出液をメンブランフィルターでろ過し，LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした．

## 3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各検量線作成用シアヌル酸標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し，選択反応検出（以下「SRM」という．）クロマトグラムを得た．測定条件を Table 2 及び 3 に示した．

Table 2 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	SeQuant ZIC-HILIC (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), Merck Millipore
Mobile phase	Solution A – solution B (19:1) (hold for 8 min) → 2 min → (2:3) (hold for 10 min) → 2 min → (19:1) (hold for 5 min) Solution A: 10 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (1:19) Solution B: 1 mmol/L ammonium acetate solution (10 mL) was filled up to 1 L with acetonitrile-water (1:1)
Flow rate	0.3 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	N <sub>2</sub> (3 L/min)
Drying gas	N <sub>2</sub> (15 L/min)
Interface temperature	350 °C
Heat block temperature	300 °C
Desolvation line temperature	250 °C

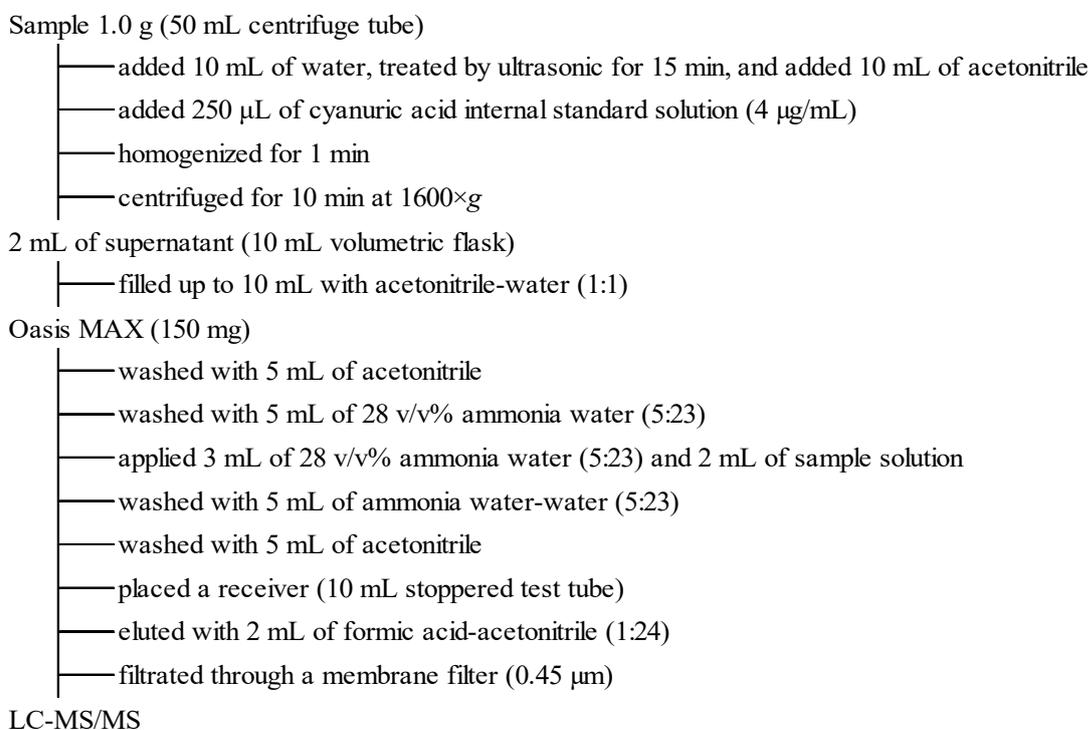
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )	
Cyanuric acid	128	42	-	17
		-	85	10
Cyanuric acid- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	131	43	-	16
		-	87	11

#### 4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからシアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のシアヌル酸量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for cyanuric acid in feed

#### 2.5 カラム処理の検討方法

本法に従って抽出を行い、遠心分離後の上澄み液 1, 2 及び 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れた後、シアヌル酸 (2.5 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 12.5, 25 及び 50 ng/mL) 及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  (1 mg/kg 相当量, 同 5, 10 及び 25 ng/mL 相当量) を加え、試料溶液をミニカラムに負荷した。更にアンモニア水 (5+23) 5 mL をミニカラムに加えて流出させた後、アセトニトリル 5 mL をミニカラムに加えて全量を流出させた。また、同じ全量フラスコの試料溶液をミニカラムに負荷した後、アセトニトリル 5 mL, アンモニア水 (5+23) 5 mL の順でミニカラムに加えて同様に流出させた。その後、本法に従い操作し、LC-MS/MS で測定した後、絶対検量線法によりシアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  の回収率を求めた。なお、回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

#### 2.6 妨害物質の検討で用いた定量方法

2.4 に従って得られたピークに妨害ピークが重なっているか確認するため、LC-MS/MS 測定条件のうちカラム及びグラジェントを以下のとおり変更することにより確認を行った。なお、液体クロマトグラフ部の測定条件以外は 2.4 に従った。

カラム : TSK gel Amide-80 (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3  $\mu\text{m}$ ) 東ソー製

溶 離 液：10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (19+1) (8 min 保持) →  
2 min → (2+3) (10 min 保持) → 2 min → (19+1) (5 min 保持)

流 速：0.3 mL/min

カラム槽温度：40 °C

## 2.7 添加回収試験

2.2 の 2) のシアヌル酸標準原液を超音波処理した後、水で正確に希釈し添加に用いた。

シアヌル酸として、0.5 及び 2.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 25 ng/mL）になるよう試料にそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。なお、回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 シアヌル酸標準原液の超音波処理

今回の検討において、検量線作成用標準液を LC-MS/MS で測定した際にシアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  のピークの強度が低下し、形状が不良となり、定量が困難な場合があった。そこで、ガラスへの吸着が疑われたため、検量線作成用標準液を調製する前にシアヌル酸標準原液及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  内標準原液を超音波処理したところ、当該事項が改善されたため、以後は同操作を実施することとした。

### 3.2 脱脂粉乳中のシアヌル酸の分析法の検討

#### 1) カラム処理の検討

##### i 令和元年度の結果の検証

令和元年度の飼料分析基準検討会に報告したカラム処理の検討において、シアヌル酸とシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  の回収率が乖離する結果となった。このことは本来であれば起こりえない現象であり、LC-MS/MS のパラメーター設定等に何らかの問題があると飼料分析基準検討会外部委員より指摘を受けた。

当該事項を検証するため、2.5 により令和元年度と同一の脱脂粉乳を用いて再度検討を実施した。なお、内標準法ではシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  によりシアヌル酸の回収率が補正されるため、イオン化阻害等による見かけの回収率の低下を把握しづらいことから絶対検量線法によりシアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  の回収率を求めた。その結果は Table 4 のとおり、シアヌル酸とシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  の回収率に乖離は認められなかった。令和元年度の結果の再現性が得られず、原因究明が困難な状況となったが、結果が改善されたこと、また、LC-MS/MS のパラメーター設定にも問題は認められなかったことから、当該事項の改善を目的とした分析操作、測定条件等について令和元年度からの変更は行わずに以降の検討を進めることとした。なお、当検討の前には機器メーカーのメンテナンスにより LC-MS/MS の MS 部の洗浄を行っている。併せて、LC-MS での測定も検討したが、シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  のピークが妨害ピークと重なり、定量が困難であった。

Table 4 Effects of dilution factor of supernatant and washing mini column on recoveries for cyanuric acid and cyanuric acid-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>

Order of washing solution flow	Dilution factor of supernatant	Recovery <sup>a)</sup> (%)	
		Cyanuric acid <sup>b)</sup>	Cyanuric acid- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> <sup>b)</sup>
Acetonitrile	2.5	46.5	44.4
→	5	79.8	78.4
Ammonia water-water (5:23)	10	75.7	71.0
Ammonia water-water (5:23)	2.5	36.7	34.4
→	5	66.2	63.6
Acetonitrile	10	75.4	73.9

a) Mean (n = 2)

b) Absolute calibration curve method

ii カラム処理の洗浄順の検討

試料溶液負荷後のミニカラムの洗浄については、令和元年度の報告ではアセトニトリル、アンモニア水（5+23）の順で行うこととしたが、カラム処理後に得られた試料溶液に白濁が見られたこと、また、アンモニア水の残存量により溶出液の pH が変わり、LC-MS/MS による測定値に影響が出ることが懸念されることから、洗浄の順番をアンモニア水（5+23）、アセトニトリルに変更することについて検討を行った。

令和元年度とは異なる脱脂粉乳を用いて 2.5 によりシアヌル酸及びシアヌル酸-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> の回収率を求めた。Table 4 の結果から、遠心分離後の上澄み液を 10 倍希釈した場合でも良好な結果であったが、目標とする定量下限相当濃度（0.5 mg/kg 相当量、最終試料溶液中で 2.5 ng/mL）を測定した時に得られるピークの SN 比が 10 未満となることが懸念されたため、5 倍希釈で実施することとした。その結果は Table 5 のとおりであり、アンモニア水（5+23）、アセトニトリルの順で洗浄した方法では、カラム処理後に得られた試料溶液に白濁が見られず、シアヌル酸及びシアヌル酸-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> の回収率はアセトニトリル、アンモニア水（5+23）の順で洗浄した方法と同様に良好な結果であった。よって、試料溶液負荷後のミニカラムの洗浄はアンモニア水（5+23）、アセトニトリルの順で行うこととした。

Table 5 Effects of washing mini column on recoveries for cyanuric acid and cyanuric acid-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>

Order of washing solution flow	Dilution factor of supernatant	Recovery <sup>a)</sup> (%)	
		Cyanuric acid <sup>b)</sup>	Cyanuric acid- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> <sup>b)</sup>
Acetonitrile → Ammonia water-water (5:23)	5	75.8	81.8
Ammonia water-water (5:23) → Acetonitrile	5	87.2	89.2

a) Mean (n = 2)

b) Absolute calibration curve method

2) 妨害物質の検討

脱脂粉乳 3 検体を用い、2.4 により調製（ただしシアヌル酸-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 内標準液は添加せず。）した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認した。その結果、全

てシアヌル酸と同じ保持時間にピークが認められ (0.13~0.27 mg/kg) , 定量イオンと確認イオンの比も標準液と同等であった. そこで, 2.6 に従ってカラム及びグラジェント条件を変更して確認を行ったところ, シアヌル酸の定量値に大きな違いがなかったことから, 当該ピークはシアヌル酸であると判断し, いずれの試料においてもシアヌル酸の定量を妨げるピークは認められなかった. また, シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ については保持時間にピークは認められなかった.

なお, 得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した.

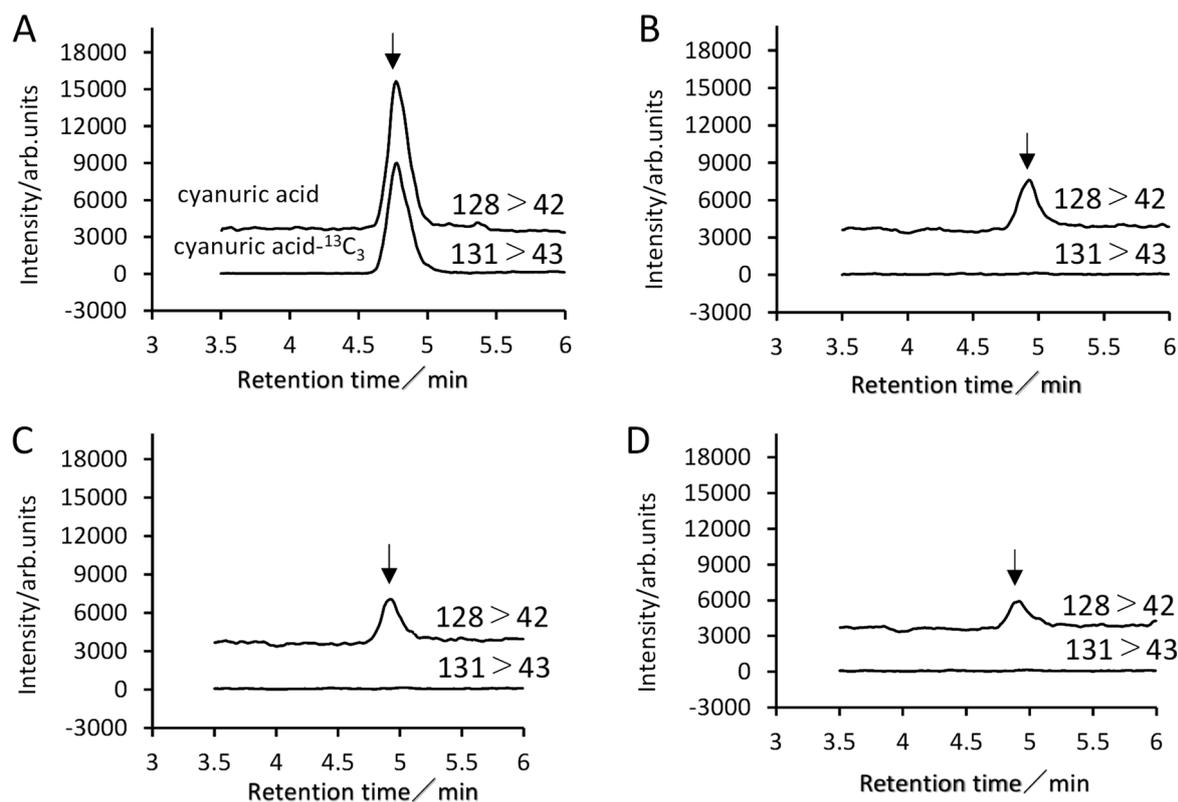


Fig. 2 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of cyanuric acid and cyanuric acid- $^{13}\text{C}_3$  in standard and sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention times of cyanuric acid and cyanuric acid- $^{13}\text{C}_3$ .)

A: Standard solution (10 ng/mL: 0.05 ng as cyanuric acid)

B~D: Sample solutions (dried skim milk)

### 3) 添加回収試験

脱脂粉乳 2 検体について, 2.7 により添加回収試験を実施した. その結果は Table 6 のとおり, シアヌル酸の平均回収率は 89.3~108 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub>) として 9.6 %以下の成績が得られた. また, シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の平均回収率は 50.4~76.7 %であった. これらは, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値 (真度: 70 %以上 120 %以下, 内標準の回収率: 40 %以上, 精度: 17.7 %以下 (添加濃度: 0.5 mg/kg) 又は 13.9 %以下 (添加濃度: 2.5 mg/kg) ) を満たす結果であった.

なお, 得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した.

Table 6 Recoveries for cyanuric acid

Spiked level (mg/kg)	Dried skim milk 1		Dried skim milk 2	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
0.5	108	9.0	107	9.6
2.5	89.3	2.2	100	4.8

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

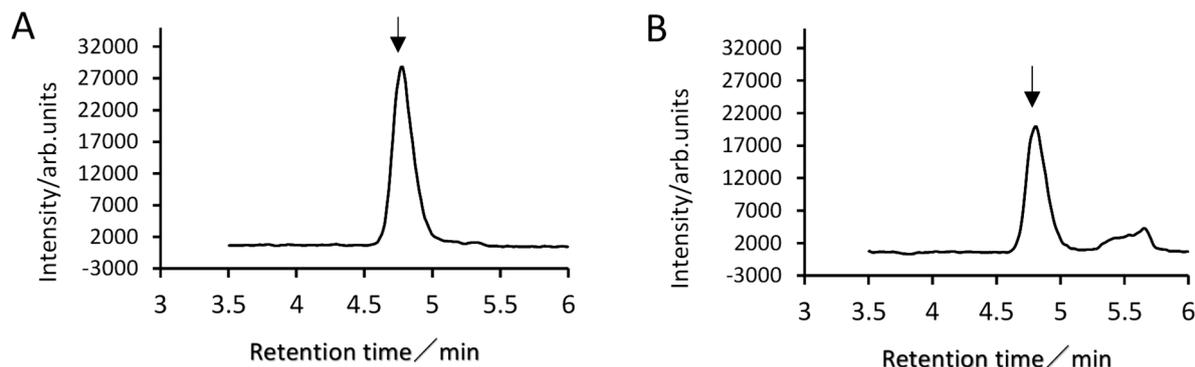


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of cyanuric acid in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of cyanuric acid.)

A: Standard solution (25 ng/mL: 0.125 ng as cyanuric acid)

B: Sample solution of dried skim milk (spiked at 2.5 mg/kg of cyanuric acid (as 25 ng/mL in sample solution))

### 3.3 脱脂粉乳以外の試料への適用拡大の検討

飼料全般について同一の分析法で効率的に分析できるようにするため、本法が脱脂粉乳以外の試料においても適用可能かどうか、以下の検討を行い確認した。

#### 1) 妨害物質の検討

鶏用配合飼料 2 検体（幼すう育成用及び成鶏飼育用）、豚用配合飼料 2 検体（ほ乳期子豚育成用及び種豚飼育用）、養魚用配合飼料 2 検体（ぶり類育成用及びこい育成用）、大豆油かす 2 検体、魚粉 2 検体、イカミール 2 検体、エビミール 2 検体を用い、3.2 と同様に妨害物質の検討を行った。その結果、全てシアヌル酸と同じ保持時間にピークが認められ（0.04~0.54 mg/kg）、定量イオンと確認イオンの比も標準液と同等であった。そこで、2.6 に従ってカラム及びグラジェント条件を変更して確認を行ったところ、その定量値に大きな違いがなかったことから、当該ピークはシアヌル酸であると判断し、いずれの試料においてもシアヌル酸の定量を妨げるピークは認められなかった。また、シアヌル酸-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> については保持時間にピークは認められなかった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

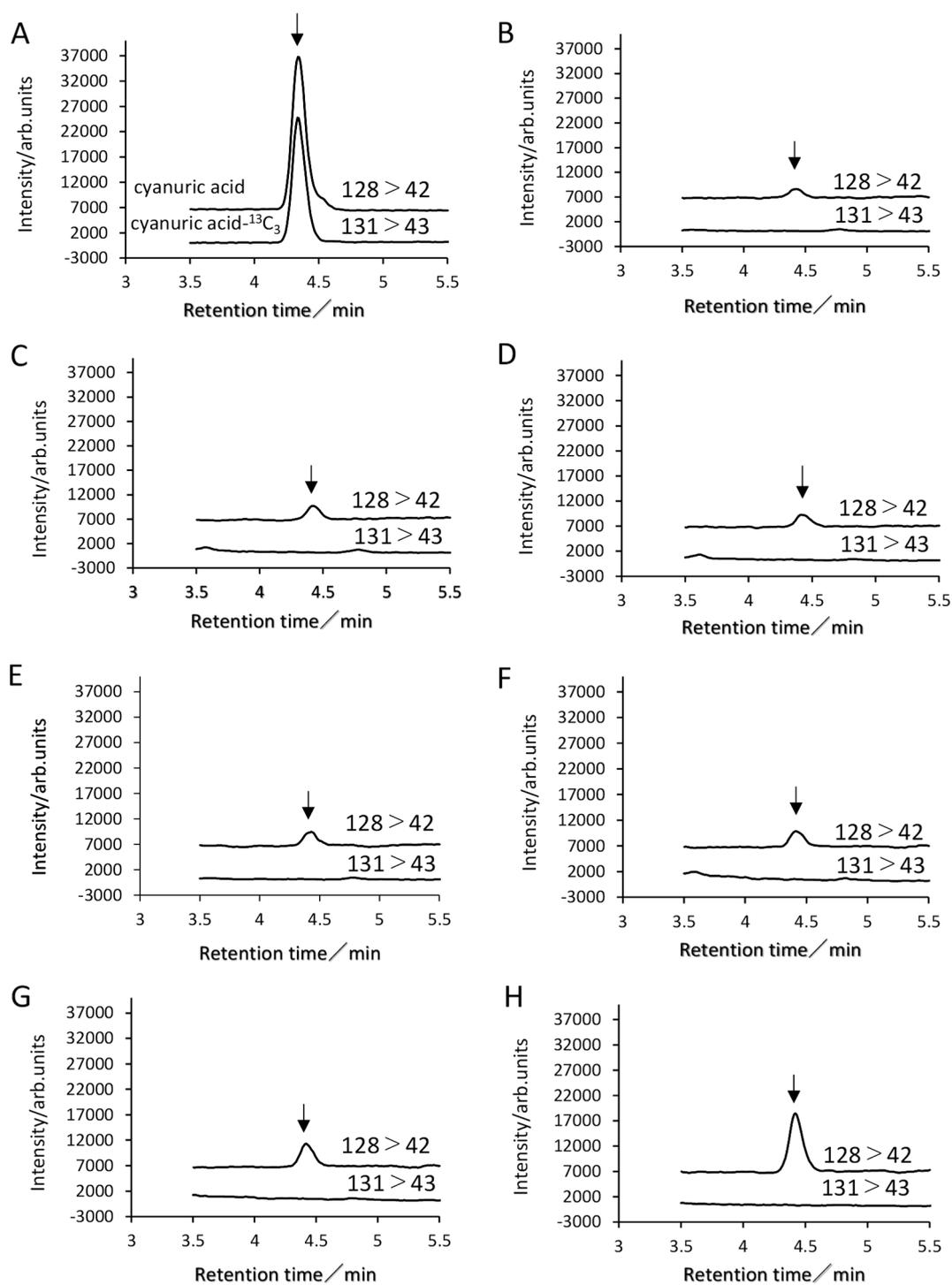


Fig. 4 Typical SRM chromatograms of cyanuric acid and cyanuric acid-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> in standard and sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention times of cyanuric acid and cyanuric acid-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>)

A: Standard solution (10 ng/mL: 0.05 ng as cyanuric acid)

B~H: Blank sample solutions (B: formula feed for layers, C: formula feed for breeding pigs, D: formula feed for carps, E: soybean meal, F: fish meal, G: squid meal, H: shrimp meal)

## 2) 添加回収試験

配合飼料（成鶏飼育用及びぶり類育成用），大豆油かす及び魚粉について，2.7 により添加回収試験を実施した．その結果は Table 7 のとおり，シアヌル酸の平均回収率は 89.9~99.0 %， $RSD_r$  は 16 % 以下の成績が得られた．また，シアヌル酸- $^{13}C_3$  の平均回収率は 72.0~79.4 % であった．これらは，妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値（真度：70 % 以上 120 % 以下，内標準の回収率：40 % 以上，精度：17.7 % 以下（添加濃度：0.5 mg/kg）又は 13.9 % 以下（添加濃度：2.5 mg/kg））を満たす結果であった．

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した．

Table 7 Recoveries for cyanuric acid

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layers		Formula feed for yellowtail fish		Soybean meal		Fish meal	
	Recovery <sup>a)</sup>	$RSD_r$ <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	$RSD_r$ <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	$RSD_r$ <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	$RSD_r$ <sup>b)</sup>
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0.5	99.0	7.2	93.3	2.5	89.9	5.8	98.1	16
2.5	98.9	1.7	95.3	1.0	94.4	1.0	96.2	2.5

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

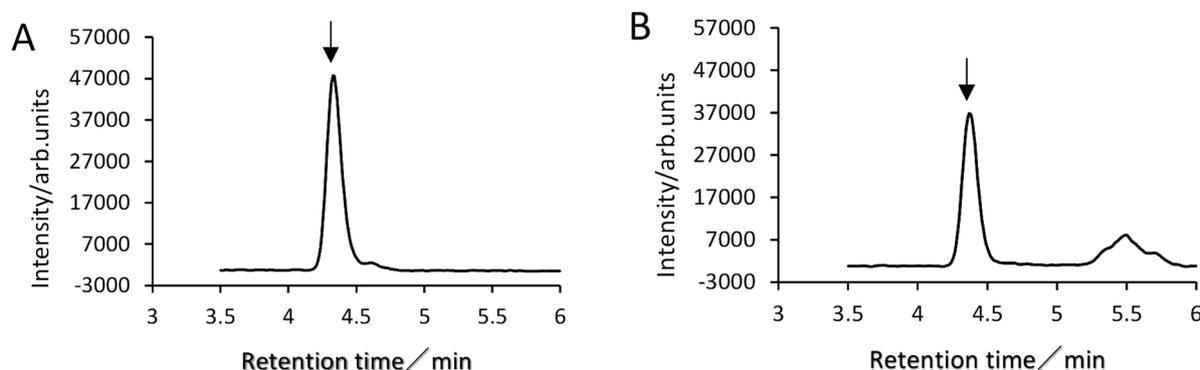


Fig. 5 Typical SRM chromatograms of cyanuric acid in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of cyanuric acid.)

A: Standard solution (25 ng/mL: 0.125 ng as cyanuric acid)

B: Sample solution of fish meal (spiked at 2.5 mg/kg of cyanuric acid (as 25 ng/mL in sample solution))

## 3.4 定量下限及び検出下限の検討

シアヌル酸の検量線が直線性を示した範囲，各 2.5~200 ng/mL の下端付近となる濃度（試料中で 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中濃度 5 ng/mL 相当量））の添加回収試験の結果は良好であり（Table 6 及び 7），得られたピークの  $SN$  比が 10 以上であったため，本法のシアヌル酸の定量下限の濃度は試料中で 0.5 mg/kg とした．この濃度は，飼料中のシアヌル酸の基準値 2.5 mg/kg に対して 1/5 であり，妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（基準値に対して 1/5 以下）を満たしていた．

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 以上となる濃度を求めた。その結果、検出下限は試料中で 0.2 mg/kg であり、同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（基準値に対して 1/10 以下）を満たしていた。

#### 4 まとめ

脱脂粉乳中に含有するシアヌル酸について、LC-MS/MS を用いた分析法の飼料分析基準への収載の可否を検討した。さらに、脱脂粉乳以外の試料で本法が適用可能か検討した。ミニカラムの洗浄を令和元年度に検討した順番とは逆の、アンモニア水（5+23）、アセトニトリルの順に変更し、以下の結果が得られた。

- 1) 脱脂粉乳 3 検体、鶏用配合飼料 2 検体（幼すう育成用及び成鶏飼育用）、豚用配合飼料 2 検体（ほ乳期子豚育成用及び種豚飼育用）、養魚用配合飼料 2 検体（ぶり類育成用及びこい育成用）、大豆油かす 2 検体、魚粉 2 検体、イカミール 2 検体、エビミール 2 検体について、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 2) 脱脂粉乳、配合飼料（成鶏飼育用及びぶり類育成用）、大豆油かす及び魚粉にシアヌル酸として 0.5 及び 2.5 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 3) 本法のシアヌル酸の定量下限は 0.5 mg/kg、検出下限は 0.15 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

#### 文 献

- 1) E. Braekevelt, B. P.-Y. Lau, S. Feng, C. Ménard and S. A. Tittlemier : Determination of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid in infant formula purchased in Canada by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Additives and Contaminants*, **28**, 698-704 (2011).
- 2) Sherri Turnipseed, Christine Casey, Cristina Nochetto and David N. Heller : Determination of melamine and cyanuric acid residues in infant formula using LC-MS/MS, *Laboratory Information Bulletin No.4421*, **24**, 1-14 (2008), U.S. Food and Drug Administration.
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) Michael Smoker and Alexander J. Krynitsky : Interim method for determination of melamine and cyanuric acid residues in foods using LC-MS/MS: Version 1.0, *Laboratory Information Bulletin No.4422*, 1-26 (2008), U.S. Food and Drug Administration.
- 6) 長久保 眞平，野村 昌代，青山 幸二：飼料中のシアヌル酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の検討，*飼料研究報告*，**44**，38-48 (2019).
- 7) 沼田 歩美，高橋 雄一，長久保 眞平：脱脂粉乳中のシアヌル酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発，*飼料研究報告*，**45**，28-38 (2020).

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

伊藤 紗織<sup>\*1</sup>, 林 菜月<sup>\*2</sup>

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

ITOU Saori<sup>\*1</sup> and HAYASHI Natsuki<sup>\*2</sup>

(\*<sup>1</sup> Fertilizer and Feed inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)  
(Now Food Labeling Monitoring Department, FAMIC),

<sup>\*2</sup> Fertilizer and Feed inspection Department, FAMIC)

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

Having added 5 mL of nitric acid, 2 mL of hydrogen peroxide and 0.4 mL of gold solution to samples, they were processed by a microwave digestion system. Having further added rhodium and rhenium as internal standard to the digested samples, arsenic, cadmium, lead and mercury were respectively quantified by ICP-MS.

Recovery tests were conducted on grass hay (alfalfa hay). The resulting mean recoveries ranged from 104 % to 107 % for arsenic, 95.7 % to 96.5 % for cadmium, 84.9 % to 91.6 % for lead, and 82.5 % to 89.6 % for mercury. The repeatability in the form of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>) was less than 5.8 % for arsenic, less than 5.3 % for cadmium, less than 12 % for lead, and less than 1.8 % for mercury.

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

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

## 1 緒 言

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

有害重金属等の分析法としては, 試料の灰化（水銀及び砒素を除く.）の後, 酸による溶解を行い, 水銀については還元気化水銀測定装置により測定, カドミウム, 鉛及び砒素については原子吸光度計により測定する方法が飼料分析基準<sup>3)</sup>及び愛玩動物用飼料等の検査法<sup>4)</sup>（以下「PF 検査法」という.）に記載されている. これらの分析法は, 前処理に時間を要し, 測定も元素ごとに個別に行う必要があるため迅速性に欠ける.

近年, 食品検査等の分野では, マイクロ波分解装置を用いた前処理時間の短縮化, 誘導結合プラ

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

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

ズマ質量分析計（以下「ICP-MS」という。）による多元素同時分析が実用化されている。そこで、平成30年度に田端らは、肥料等試験法<sup>5)</sup>及びAOAC Official Method 2015.01<sup>6)</sup>を基に有害重金属等のICP-MSによる分析法を開発し<sup>7)</sup>、令和元年度に野村らは、その分析法に一部変更を加え、飼料の一部（配合飼料等）及び愛玩動物用飼料の一部（ドライ製品等）に対する妥当性の検証を実施した<sup>8)</sup>。

今回は、令和元年度に実施した選択性の確認において、本法及び飼料分析基準に収載の分析法（以下「飼料分析基準法」という。）から得られた定量値に齟齬が認められた稲わらについて、その原因究明を実施し、また、令和元年度に検討した分析法について、検討時に実施していない飼料の一部（乾牧草）及び愛玩動物用飼料の一部（ジャーキー等）に対する妥当性を検証したので、その概要を報告する。

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

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

## 2 実験方法

### 2.1 試料

#### 1) 飼料及び愛玩動物用飼料

配合飼料（乳用牛飼育用）、乾牧草（アルファルファ乾草及びクレイングラス乾草）及び稲わらは、それぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機 1 又は粉砕機 2 で粉砕し、分析用試料とした。愛玩動物用飼料の素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）は、有姿のままでは粉砕が困難であったため、はさみで裁断した後、粉砕機 3 で粉砕し、目開き 1 mm の篩を通過したものを分析用試料とした。粉ミルクはそのまま分析用試料として用いた。

なお、検討に用いた配合飼料を Table 2 に、愛玩動物用飼料を Table 3 に示した。

Table 2 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)		Ingredients
For dairy cattle	Grains	61		Heat-treated corn, barley, corn, extruded soybeans
	Oil seed meal	14		Soybean meal
	Brans	8		Wheat bran, corn gluten feed, soybean hull
	Others	17		Cotton seed, alfalfa meal, soybean curd residue, molasses, salt, calcium carbonate, feed additives

Table 3 Ingredients list of pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Dried jerky for dogs (hard type)	Chicken breast tender, preservative (potassium sorbate), antioxidants (sodium nitrite), color former (sodium nitrite)
Milk powder for cats	Milk protein, animal fat, dried skim milk, vegetable fat, egg yolk powder, milk oligosaccharide, dried yeast, pH adjuster, emulsifier, taurine, L-arginine, L-cystine, DHA, vitamins (V. A, V. D, V. E, V. B <sub>1</sub> , V. B <sub>2</sub> , pantothenic acid, niacin, V. B <sub>6</sub> , folic acid, carotene, biotin, V. B <sub>12</sub> , V. C, choline), minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se), nucleotide, flavour (milk cream)

## 2) FAPAS 試料

The Food and Environment Research Agency で主催している, Food Analysis Performance Assessment Scheme (以下「FAPAS」という.) の Proficiency test 07353 の分析用試料 T07353 (Metallic contaminants in Animal Feed) を使用した.

## 2.2 試薬

- 1) 塩酸及び硝酸は Ultrapur-100 (関東化学製) を用いた. 過酸化水素及び酢酸は Ultrapur (関東化学製) を用いた. L-システイン酸は和光特級 (富士フイルム和光純薬製) を用いた. 水は Milli-Q Integral 5 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた.
- 2) 希釈溶媒 (10 µg/mL L-システイン酸含有塩酸-酢酸-硝酸-水 (5+6+10+179) )  
L-システイン酸 1 mg を 100 mL の定容用チューブに入れ, 水を 70 mL 加えた. これに塩酸 2.5 mL, 酢酸 3 mL 及び硝酸 5 mL を加え, 更に標線まで水を加えて希釈溶媒を調製した.
- 3) 標準原液  
砒素, カドミウム, 鉛, 水銀, レニウム, ロジウム及び金の標準原液は, Table 4 に示した供給業者, 規格のものを用いた.

Table 4 Standards used in this study

Heavy metals and others	Guaranteed value (µg/mL)	Manufacturers	Specification
Arsenic standard solution	99.4, 99.6	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Cadmium standard solution	99.3	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Lead standard solution	99.4	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Mercury standard solution	100.3	Fujifilm Wako Pure Chemical	JCSS
Rhenium standard solution	1003	ACROS ORGANICS	for atomic absorption spectrochemical analysis
Rhodium standard solution	1002	Kanto Chemical	for atomic absorption spectrochemical analysis
Gold standard solution	1004	Kanto Chemical	for atomic absorption spectrochemical analysis

## 4) 重金属等混合標準原液

砒素, カドミウム, 鉛及び水銀標準原液各 750 µL を 15 mL の定容用チューブに正確に入れ

て混合し、更に標線まで希釈溶媒を加えて重金属等混合標準原液を調製した（この液 1 mL は、各重金属等としてそれぞれ 5 µg を含有）。

#### 5) 混合内標準液

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

#### 6) 金溶液

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

#### 7) 重金属等混合標準液

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

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

測定する際には、Labcon 製チューブに重金属等混合標準液を移した。

### 2.3 装置及び器具

#### 1) 粉砕機：

粉砕機 1（配合飼料（乳用牛飼育用））：

ZM 200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン、回転数 14000 rpm）

粉砕機 2（乾牧草及び稲わら用）：

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

粉砕機 3（愛玩動物用飼料用）：

GM 200 Retsch 製（回転数 10000 rpm）

#### 2) 高圧分解容器：

Anton Paar 製高圧分解容器：テフロン TFM 容器 100 mL Anton Paar 製

Milestone 製高圧分解容器：TFM 分解容器 HPV-100 Milestone 製

#### 3) マイクロ波分解装置：

Anton Paar 製マイクロ波分解装置：Multiwave 3000 Anton Paar 製

Milestone 製マイクロ波分解装置：ETHOS PLUS-HS Milestone 製

#### 4) チューブ

定容用チューブ：Digi TUBEs 15 mL, 50 mL 及び 100 mL ポリプロピレン SCP SCIENCE 製

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

Thermo 製チューブ：Sample vials 50 mL ポリプロピレン Thermo Fisher Scientific 製

#### 5) ICP-MS：

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

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

6) 沸石：PTFE 沸石 四フッ化エチレン Saint-Gobain 製

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

分析試料 0.5 g を正確に量って Anton Paar 製高压分解容器又は Milestone 製高压分解容器に入れ、硝酸 5 mL、過酸化水素 2 mL 及び金溶液 0.4 mL を加え、発泡がおさまった後 Anton Paar 製マイクロ波分解装置又は Milestone 製マイクロ波分解装置を用いて Table 5 又は Table 6 の分解プログラムによって分解した (Anton Paar 製マイクロ波分解装置を使用し分解した際の温度は、約 140~200 °C)。放冷後、分解液を 15 mL の定容用チューブに水で移し込み、更に定容用チューブの標線まで水を加え、1700×g で 5 分間遠心分離した。上澄み液 3.75 mL 及び混合内標準液 0.5 mL を 50 mL の定容用チューブに正確に入れ、希釈溶媒を定容用チューブの標線まで加え、ICP-MS による測定に供する試料溶液とした。

同時に試料を用いないで同一の操作を行い、空試験溶液を調製した。

測定する際は、Thermo 製チューブに試料溶液及び空試験溶液を移した。

Table 5 Operation condition of Anton Paar's microwave digestion

Process	Wattage (W)	Time (min)
Step 1 (Heating)	0 → 1400	10
Step 2 (Fixed electric power)	1400	40
Step 3 (Cooling)	0	30

Table 6 Operation condition of Milestone's microwave digestion

Process	Temperature (°C)	Time (min)
Step 1 (Heating)	0 → 200	10
Step 2 (Fixed electric power)	200	40
Step 3 (Cooling)	30	30

### 2) ICP-MS による測定

試料溶液、各重金属等混合標準液及び空試験溶液を ICP-MS に導入し、各モニターイオンにおけるイオンカウント値を得た。測定条件を Table 7 に示した。

Table 7 Operation conditions of ICP-MS

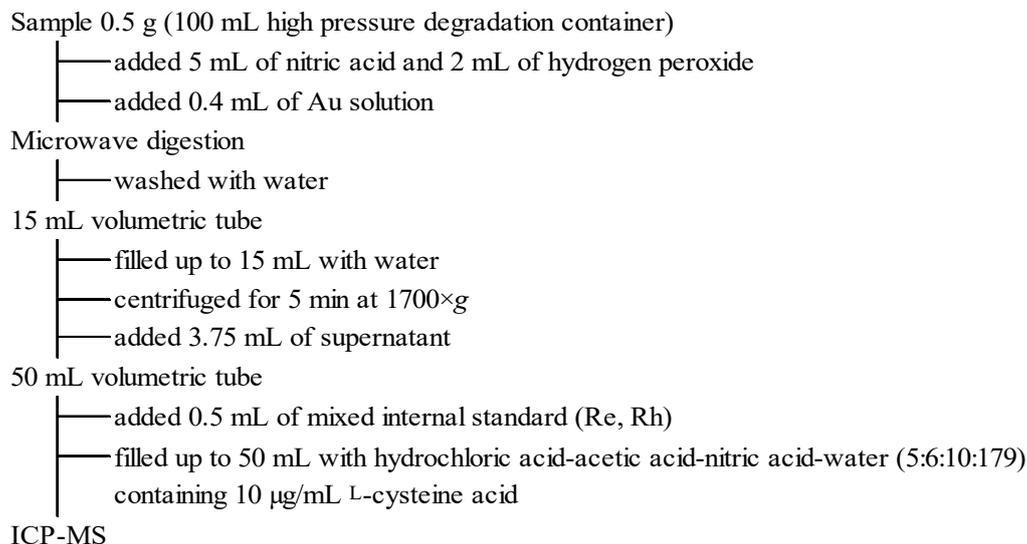
Nebulizer gas	Ar (1.08 L/min)
Plasma gas	Ar (14.0 L/min)
Auxiliary gas	Ar (0.80 L/min)
Collision gas	He (4.34 L/min)
High-frequency output	1550 W
Monitor ion	<sup>75</sup> As, <sup>114</sup> Cd, <sup>208</sup> Pb, <sup>202</sup> Hg, <sup>103</sup> Rh, <sup>187</sup> Re

## 3) 計 算

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

空試験溶液について、正の値が得られた場合は結果を差し引いた。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



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

## 2.5 飼料分析基準法における稲わら中のカドミウム分析法の検討方法

令和元年度の検討で用いた稲わら 5.0 g を 100 mL のトルビーカーに入れ、飼料分析基準第 4 章第 1 節 12.1 に従って灰化した。これに塩酸 10 mL 及び水 20 mL を加えた後、165 °C に設定したホットプレート上で 5 分間加熱した。突沸しなかった場合、いったん加熱をやめ、ホットプレートの設定温度を 10 °C 上げた後、再び加熱した。この操作を繰り返し、試料溶液が突沸する温度を確認した。試料溶液が突沸した温度よりも 10 °C 低い温度を加熱温度とし、通常の加熱温度 (205 °C) との差から必要な加熱時間を求めて加熱し、得られた試料溶液中のカドミウム量を飼料分析基準に従い測定した。また、沸石による突沸の防止効果を検証するため、PTFE 製の沸石を試料溶液に少量加えた後、同一の操作を行い、試料溶液が突沸する温度を調べた。

なお、同時に試料を用いずに同一の操作を行い、空試験溶液を調製した。空試験溶液について、正の値が得られた場合は結果を差し引き、試料溶液中のカドミウム量を算出した。

## 2.6 マイクロ波分解装置の検討

配合飼料 (乳用牛飼育用) 及び FAPAS 試料を、2.4 の 1) の Table 5 及び Table 6 の分解プログラムにより分解し、その後 2.4 の 2) 及び 3) に従い、試料溶液中の重金属等量を測定した。

なお、同時に試料を用いないで同一の操作を行い、空試験溶液を調製した。空試験溶液について、正の値が得られた場合は結果を差し引き、試料溶液中の重金属等量を算出した。

## 2.7 添加回収試験

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

アルファルファ乾草及び愛玩動物用飼料 (素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ犬用) 及び粉ミ

ルク（猫用））について、各重金属等をそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

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

## 2.8 高压分解容器の汚染の確認

試料を用いずに、硝酸 5 mL、過酸化水素 2 mL 及び金溶液 0.4 mL を高压分解容器に入れ、2.4 の 1) の Table 5 の分解プログラムを適用して加熱し、その後、2.4 の 2) 及び 3) に従い、試料溶液中の重金属等量を測定した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 飼料分析基準法における稲わら中のカドミウム分析法の検討

令和元年度に実施した選択性の確認において、本法及び飼料分析基準法に従い稲わら中のカドミウムの定量値を求めたところ、前者が 0.211 mg/kg、後者が 0.175 mg/kg となった<sup>8)</sup>。稲わらはケイ酸含有量が多く突沸しやすいため、飼料分析基準法では通常（205 °C 以上）より低い温度（185 °C）でしか加熱できなかった。そのため、分解不十分となり、定量値に差が生じたと考えられた。

一般的に、反応温度を 10 °C 下げると反応速度は半分になるため、2倍の時間が必要となる。そのため、加熱温度を下げても加熱時間を延ばすことにより、通常の加熱条件と同じ熱量で試料を分解することが可能になると考えられる。そこで 2.5 に従い、突沸する温度よりも低い温度で加熱時間を延ばすことにより、稲わら中のカドミウムを突沸させずに定量することを試みた。用いた稲わらは 185 °C で突沸したため、175 °C で 40 分間加熱したところ、カドミウムの定量値は 0.107 mg/kg となり、令和元年度よりも低い値となった。また、突沸防止として沸石を加えたが、同様に突沸したことから、沸石による分解操作の改良には至らなかった。

### 3.2 マイクロ波分解装置の検討

令和元年度の検討に使用していた Anton Paar 製マイクロ波分解装置は、分解条件を出力で設定している。本検討に使用できるマイクロ波分解装置の種類を増やすため、分解条件を温度で設定できる Milestone 製マイクロ波分解装置を本検討に適用できないかを検討した。

配合飼料（乳用牛飼育用）及び FAPAS 試料について、2.6 に従い重金属等を定量した。その結果は Table 8 のとおり、Anton Paar 製マイクロ波分解装置で分解した場合と Milestone 製マイクロ波分解装置で分解した場合との間で、いずれも定量値に大きな差は見られなかった。そのため、今後の検討で Milestone 製マイクロ波分解装置を用いても問題はないと考えられた。

Table 8 Comparison between microwave digestion systems

Sample types	Manufacturers	Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury
		Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)
Formula feed for dairy cattle	Anton Paar	0.023	0.038	0.025	ND
	Milestone	0.012	0.036	0.031	ND
FAPAS	Anton Paar	0.297	0.203	2.111	0.024
	Milestone	0.316	0.209	2.142	0.028
FAPAS assigned value		0.321	0.204	2.176	0.036
Quantitative value (mg/kg) in the range $-2 \leq z \leq 2$	upper value	0.443	0.287	2.795	0.051
	lower value	0.199	0.121	1.556	0.020

ND: Not detected

$n = 1$

### 3.3 選択性の確認

飼料分析基準法により重金属等が検出されたクレイングラス乾草について、本法により分析し、試料由来の妨害物質が各重金属等の定量に及ぼす影響の調査を実施した。その結果は Table 9 のとおりであった。

砒素及び鉛が本法及び飼料分析基準法で検出された。それらの定量値は、本法と飼料分析基準法で差が認められたが、飼料分析基準法により得られた定量値は定量下限未満の値であった。また、飼料分析基準法で不検出であったカドミウムが本法により検出されたが、本法における定量下限未満の値であった。

以上の結果について、定量下限未満の値はばらつきがあることを考慮すると、本法により得られた定量値は分析対象の自然汚染のものと考えられ、定量に影響するような妨害はなく、本法の選択性に問題はないと考えられた。

Table 9 Quantitative results of klein grass hay of this method and analytical standards method of feeds

Sample types	Analytical methods	Arsenic	Cadmium	Lead	Mercury
		Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)	Quantitative value (mg/kg)
Grass hay (Klein grass hay)	This method	0.137	(0.039)	0.173	ND
	Analytical standards method of feeds	(0.079)	ND <sup>a)</sup>	(0.427) <sup>a)</sup>	ND <sup>a)</sup>
This method	Limit of quantification (LOQ) (mg/kg)	0.04	0.04	0.04	0.04
	Limit of detection (LOD) (mg/kg)	0.02	0.02	0.02	0.02
Analytical standards method for feeds	LOQ (mg/kg)	0.2	0.10	0.5	0.03
	LOD (mg/kg)	0.05	0.03	0.2	0.01

ND: Not detected

( ): less than the limit of quantification

Except where noted: Mean ( $n = 3$ )

a)  $n = 1$

### 3.4 添加回収試験

アルファルファ乾草及び愛玩動物用飼料（素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬用）及び粉ミルク（猫用））を用い、2.7により添加回収試験を実施した。

アルファルファ乾草の結果は、Table 10のとおり、砒素については平均回収率 104~107 %、その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 5.8 %以下、カドミウムについては平均回収率 95.7~96.5 %、 $RSD_r$ は 5.3 %以下、鉛については平均回収率 84.9~91.6 %、 $RSD_r$ は 12 %以下、水銀については平均回収率 82.5~89.6 %、 $RSD_r$ は 1.8 %以下の成績が得られ、飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた 1) 及び 2) の真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

1) 真度：70 %以上 120 %以下

2) 精度：22 %以下（添加濃度 0.04 mg/kg）、18 %以下（同 0.4 mg/kg）、16 %以下（同 1 mg/kg）、14 %以下（同 3 mg/kg）

愛玩動物用飼料（素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬用）及び粉ミルク（猫用））の結果は、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬用）の定量下限付近の添加回収試験において、砒素については過回収となり PF 検査法第 11 章試験法の妥当性確認法（以下「PF 検査法の妥当性確認法」という。）に定められた真度の目標値を満たさず、鉛については定量値のばらつきが大きく、真度及び併行精度の目標値を満たさなかった。また、粉ミルク（猫用）の基準値相当の添加回収試験においては、砒素が過回収となり真度の目標値を満たさなかった。

Table 10 Recoveries for arsenic, cadmium, lead and mercury

Sample types	Arsenic				Cadmium			
	Natural contamination	Spiked level	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup>	Natural contamination	Spiked level	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup>
	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)
Alfalfa hay	0.026	0.04	107	5.8	0.059	0.04	95.7	5.3
	0.040	7	104	1.4	0.056	1	96.5	0.7

Sample types	Lead				Mercury			
	Natural contamination	Spiked level	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup>	Natural contamination	Spiked level	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup>
	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)	(%)
Alfalfa hay	0.031	0.04	91.6	12	ND	0.04	82.5	1.8
	0.020	3	84.9	1.6	ND	0.4	89.6	1.6

ND: Not detected

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

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.5 高圧分解容器に蓄積した重金属等の溶出の確認

3.4 のとおり、愛玩動物用飼料（素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬用）及び粉ミルク（猫用））について添加回収試験を実施したが、PF 検査法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値を満たさなかった。

この原因の一つとして、高圧分解容器からの重金属等の溶出によるバックグラウンド値の上昇が考えられた。そこで、2.8 に従い各高圧分解容器（16 本）のバックグラウンド値を測定し、濃度 0 ng/mL 及び 0.05 ng/mL の重金属等混合標準液のイオンカウント値と比較した。その結果は Table 11 のとおり、鉛において、0.05 ng/mL の標準液（定量下限（0.04 mg/kg）相当の 1/2）よりも大きなイオンカウント値を示す高圧分解容器が存在した。このことから、真度及び併行精度の目標値を満たさなかった原因は、高圧分解容器に蓄積した重金属等の溶出であると考えられた。

また、その他の原因として、分解温度にムラがあったことが考えられた。使用回数の多い高圧分解容器は酸蒸気が染み込みやすく、これにより加熱温度にムラが生じるが、添加回収試験時のマイクロ波分解装置における各高圧分解容器のモニター温度が 140~200 °C であったため、分解不十分の試料が生じ、定量値にばらつきが出たと考えられた。

従って、本法における微量元素の分析においては、高圧分解容器中の金属元素や酸の蓄積を無視できないため、容器のメンテナンス方法の改良が必要であると考えられた。

Table 11 Comparison of ion count values between instrument blank from microwave digestion vessels and mixed standard solutions

Heavy metals and others	Ion count value of each microwave digestion vessels <sup>a)</sup>		Ion count value of 0 ng/mL mixed standard solution <sup>b)</sup>	Ion count value of 0.05 ng/mL mixed standard solution <sup>b)</sup>
	(cps)			
Arsenic	57	~ 77	93	381
Cadmium	12	~ 55	18	1553
Lead	2581	~ 27021	2288	13812
Mercury	78	~ 497	138	1972

a)  $n = 1$ b) Mean ( $n = 2$ )

#### 4 まとめ

飼料分析基準法における稲わら中のカドミウム分析法の検討として、稲わらを灰化後、酸で通常よりも低い温度で長時間加熱したところ、得られた定量値は令和元年度よりも低い値となった。また、突沸防止として沸石を加えたが、同様に突沸したことから、沸石による分解操作の改良には至らなかった。

また、飼料及び愛玩動物用飼料に含まれる有害重金属等の定量について、平成 30 年度に開発し、令和元年度に一部変更を加えた ICP-MS を用いた多元素同時分析法の飼料分析基準及び PF 検査法への掲載の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 令和元年度に用いたものとは異なるマイクロ波分解装置について、本法への適用の可否を検討したところ、適用可能と考えられた。
- 2) クレイングラス乾草について、本法により試料中の各重金属等の量を算出した結果、各重金属等が検出されたが、本法で得られた定量値は分析対象の自然汚染のものと考えられ、本法の選択性に問題はないと考えられた。
- 3) アルファルファ乾草について各重金属等を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。また、愛玩動物用飼料（素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ犬用）及び粉ミルク（猫用））について各重金属等を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、PF 検査法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値を満たさなかった。
- 4) 高圧分解容器のバックグラウンド値を ICP-MS を用いて測定した結果、鉛において高いイオンカウント値を示す容器が存在した。また、分解容器に酸が蓄積することにより、マイクロ波分解で加熱温度にムラが生じていたと考えられたため、分解容器のメンテナンス方法の改良が必要であると考えられた。

#### 文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準の制定について、昭和 63 年 10 月 14 日、63 畜 B 第 2050 号 (1988)。

- 2) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 4) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号 (2009).
- 5) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：肥料等試験法 (2019).
- 6) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, AOAC official method 2015.01 heavy metals in food. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 7) 田端麻里，野村昌代，鈴木知華：飼料及び愛玩動物中の砒素，カドミウム，鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発，飼料研究報告，**44**，95-104 (2019).
- 8) 野村昌代，伊藤紗織，田端麻里：飼料及び愛玩動物中の砒素，カドミウム，鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発，飼料研究報告，**45**，67-83 (2020).

## 5 飼料中のフィプロニルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の追加検討及び共同試験

武田 然也<sup>\*1</sup>, 倉島 ちなみ<sup>\*2</sup>, 白井 小枝<sup>\*1</sup>, 名塚 英一<sup>\*1</sup>, 牧野 大作<sup>\*3</sup>

### Additional Consideration and Collaborative Study of Determination Method of Fipronil in Feed by LC-MS/MS

TAKEDA Zenya<sup>\*1</sup>, KURASHIMA Chinami<sup>\*2</sup>, SHIRAI Sae<sup>\*1</sup>, NAZUKA Eiichi<sup>\*1</sup> and MAKINO Daisaku<sup>\*3</sup>  
(\*<sup>2</sup> Nagoya Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), \*<sup>2</sup> Nagoya Regional Center, FAMIC (Now Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan), \*<sup>3</sup> Fukuoka Regional Center, FAMIC)

We have studied a quantitative determination method of the concentration of fipronil in feed using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS), and conducted a collaborative study.

Having added water to a sample, fipronil was extracted with acetonitrile, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then purified with liquid-liquid extraction and SPE column (InertSep GC/PSA, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of fipronil. LC separation was then carried out on an ODS column (Capcell Pak C18 MG II, 2.0 mm i.d. × 150 mm, 3 µm, Osaka Soda Co. Ltd.; Osaka, Japan) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate aqueous solution and 2 mmol/L ammonium acetate methanol solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the negative mode electrospray ionization (ESI<sup>-</sup>) was used.

As documented in the previous report, it was clarified that the recovery of fipronil in rice straw can be improved by the use of NaOH solution (0.5 w/v%) instead of phosphate buffer in liquid-liquid partition. In this report, we investigated whether the method of using NaOH solution can be applied to feeds other than rice straw. However, we concluded that the method was not applicable to feeds other than rice straw due to operational problems or low recovery of fipronil.

A collaborative study was conducted by ten laboratories using formula feed for layers, formula feed for beef cattle, wheat, alfalfa hay, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS). Those materials were added with fipronil according to the following specifications: 0.01 mg/kg for formula feed for layers, 0.0016 mg/kg for formula feed for beef cattle, 0.002 mg/kg for wheat, 0.18 mg/kg for alfalfa hay, 0.25 mg/kg for rice straw, and 0.25 mg/kg for WCRS. The resulting mean recoveries ranged from 68.8 % to 82.4 %. The repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) were less than 8.2 % and less than 9.9 % respectively. The HorRat was less than 0.45.

This method was thus validated as useful for inspections of fipronil in feed.

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

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

\*<sup>2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター, 現 農林水産省消費・安全局

\*<sup>3</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

キーワード：フィプロニル；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料；共同試験

## 1 緒 言

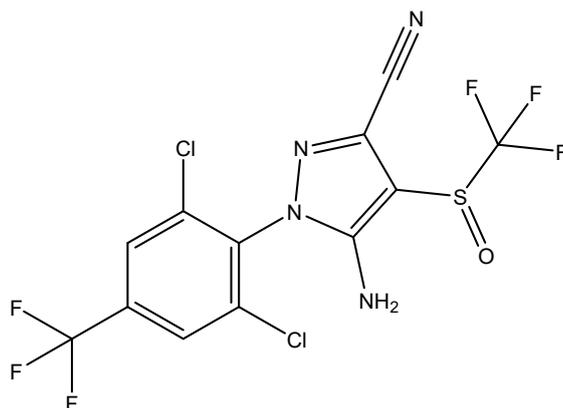
フィプロニルは、フェニルピラゾール系の殺虫剤であり、昆虫に対して神経興奮抑制を阻害することにより殺虫作用を示すと考えられている<sup>1)</sup>。我が国では1996年に初回農薬登録され、適用農作物等は水稻及び野菜等である。海外では米国、オーストラリア、ヨーロッパ及びアジア諸国において、とうもろこし、じゃがいも、米及び麦類等の穀物並びに野菜、果実等に登録がある<sup>2)</sup>。我が国の飼料中の基準値としては、えん麦、大麦、小麦及びライ麦で0.002 mg/kg、とうもろこしで0.02 mg/kg、マイロで0.01 mg/kg、稲わらで0.2 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で0.1 mg/kgと法令等により定められている<sup>3),4)</sup>。

飼料中のフィプロニルの分析法は、飼料分析基準<sup>5)</sup>においてガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法が収載されており、定量下限は0.01 mg/kgである。今年度、飼料中のフィプロニルの基準値の改正が行われたことから<sup>6)</sup>、基準値に対して十分な精確さを持つ分析法の開発が急務とされた。

これまで、一般財団法人日本食品検査が開発した分析法<sup>7)</sup>を基に、飼料中のフィプロニルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による分析法の飼料分析基準への収載の可否を検討したところ、稲わらにおいて回収率が低い傾向が認められた<sup>8)</sup>。そのため、矢野らは稲わらの分析法について更なる検討を行い、液液分配の際に用いる0.5 mol/L リン酸緩衝液の代わりに、0.5 w/v% 水酸化ナトリウム溶液を用いることで回収率が改善することを明らかにした<sup>9)</sup>。

今回、液液分配時に0.5 w/v% 水酸化ナトリウム溶液を用いる方法について稲わら以外の飼料にも適用できるかを検討した。また、これまで0.5 mol/L リン酸緩衝液のpH調整に用いる試薬を「1 mol/L 塩酸又は1 mol/L 水酸化ナトリウム」としていたが、本来は緩衝液を組成する試薬を用いてpHを調整すべきであるため、0.5 mol/L リン酸緩衝液のpH調整は「リン酸(1+10)又は1 mol/L 水酸化カリウム」を用いることとし、当該緩衝液の調製法の変更によるフィプロニルの分析結果への影響がないことを確認した。さらに、共通試料を用いた共同試験を実施し、飼料分析基準への収載の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考にフィプロニルの構造式等を以下のFig. 1に示した。



Fipronil

5-amino-1-(2,6-dichloro-4- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-4-*p*-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile

$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$  MW: 437.1 CAS No.: 120068-37-3

Fig. 1 Chemical structure of fipronil

## 2 実験方法

### 2.1 追加検討

#### 2.1.1 試料

成鶏飼育用配合飼料，小麦，とうもろこし及び乾牧草（アルファルファ乾草）は，それぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し，分析用試料とした．WCRS は，60 °C で 10 時間乾燥後，更に室内に静置して風乾した後，同様に粉砕し，分析用試料とした．

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 feed

Formula feed type	Ingredient type	Proportion (%)	Ingredients
For layers	Grains	61	Corn
	Brans	1	Rice bran
	Oil seed meal	22	Soybean meal, corn gluten meal, rapeseed meal
	Animal by-products	6	Swine and poultry by-product meal, fish meal, feather meal
	Others	10	Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, oyster shell, feed additives

#### 2.1.2 試薬

1) アセトニトリル，アセトン及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた．メタノールは LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）を用いた．塩化ナトリウム，塩酸，水酸化カリウム，水酸化ナトリウム，硫酸ナトリウム（無水），リン酸，リン酸水素二カリウム及びリン酸二水素カリウムは試薬特級を用いた．1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用（富士フィルム和光純薬製）を用いた．水は LC-MS 用の超純水（富士フィルム和光純薬製又は関東化学製）又は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211

の 5218 に定義された超純水) を用いた。

## 2) 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0)

リン酸水素二カリウム 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム 30.2 g を量り、水約 500 mL に溶解し、リン酸 (1+10) 又は 1 mol/L 水酸化カリウム溶液を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

## 3) フィプロニル標準液

フィプロニル標準品 (富士フィルム和光純薬製, 純度 99.4%) 20 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてフィプロニル標準原液を調製した (この液 1 mL は、フィプロニルとして 0.2 mg を含有)。

使用に際して、フィプロニル標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にフィプロニルとしてそれぞれ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng を含有する各標準液を調製した。

### 2.1.3 装置及び器具

#### 1) 粉砕機 :

粉砕機 1 (配合飼料, 小麦及びとうもろこし用) :

ZM-200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 18000 rpm)

粉砕機 2 (乾牧草, 稲わら及び WCRS 用) :

SM-100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

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

#### 3) グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (以下「ミニカラム」という。) : InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg) ジーエルサイエンス製

#### 4) メンブランフィルター : DISMIC-25HP (孔径 0.20 $\mu\text{m}$ , 直径 25 mm, 親水性 PTFE) 東洋濾紙製

#### 5) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : ACQUITY TQ Detector Waters 製

### 2.1.4 定量方法

#### 1) 抽出

分析試料 10.0 g (乾牧草, 稲わら及び WCRS は 5.0 g) を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 15 mL を加え、30 分間静置後、更にアセトニトリル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線までアセトニトリルを加えた。この液 20 mL を、液液分配に供する試料溶液とした。

#### 2) 液液分配

試料溶液 20 mL をあらかじめ塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 mL (稲わらは水酸化ナトリウム溶液 (0.5 w/v%) 20 mL) を入れた 100 mL の分液漏斗に正確に加え、10 分間振り混ぜた後静置し、アセトニトリル層 (上層) を 100 mL の三角フラスコに入れた。アセトニトリル層を適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、100 mL のなす形フラ

スコにろ紙（5種 B）でろ過した後、先の三角フラスコを順次少量のアセトニトリルで洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせた。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。ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とした。

### 3) カラム処理

ミニカラムをアセトン 10 mL 及びヘキサン 10 mL で順次洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下した。試料溶液の入っていた 100 mL のなす形フラスコをヘキサン 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (4+1) 15 mL をミニカラムに加えてフィプロニルを溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。メタノール 1 mL（乾牧草、稲わら及び WCRS にあっては 10 mL）を正確に加えて残留物を溶かした後、メンブランフィルターでろ過し、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

### 4) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各フィプロニル標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出（SRM）クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	Capcell Pak C18 MGII (2.0 mm i.d. × 150 mm, 3 µm), Osaka soda
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate aqueous solution- 2 mmol/L ammonium acetate methanol solution (7:3) (hold for 0.2 min) → 12.5 min → (5:95) (hold for 2.5 min) → (hold for 0.2 min) → 12.5 min → (5:95) (hold for 2.5 min) → 2 min → (7:3) (hold for 12 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Ion source temperature	120 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (700 L/h, 350 °C)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)
Capillary voltage	2.5 kV

Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )		
Fipronil	435	330	—	25	15
		—	250	25	30

## 4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中のフィプロニル量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Sample 10.0 g (5.0 g for grass hay, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS) (200 mL erlenmeyer flask))

- added 15 mL of water and allowed to stand for 30 min
- added 100 mL of acetonitrile and shook for 30 min
- filtered through filter paper (No. 5B of JIS P3801) under reduced pressure
- washed with 50 mL of acetonitrile
- filled up to 200 mL with acetonitrile

Transferred 20 mL of sample solution to a 100 mL separating funnel

- added 10 g of sodium chloride and 20 mL of 0.5 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) (20 mL of NaOH solution (0.5 w/v%) for rice straw)
- shook for 10 min and allowed to stand for a while
- discarded the water layer and transferred the acetonitrile layer to a 100 mL erlenmeyer flask
- added some amount of sodium sulfate and dehydrated the acetonitrile layer
- filtrated through filter paper (No. 5B of JIS P3801) to a 100 mL eggplant flask
- washed the erlenmeyer flask with acetonitrile and filtrated to the eggplant flask
- evaporated to dryness under 40 °C
- dissolved in 2 mL of hexane

GC/PSA column (500 mg/500 mg)

- prewashed with 10 mL of acetone and 10 mL of hexane
- applied sample solution and let it flow out
- washed the eggplant flask with 5 mL of hexane and eluted (twice)
- set a reciever (50 mL eggplant flask)
- eluted with 15 mL of hexane-acetone (4:1)
- evaporated to dryness under 40 °C
- dissolved in 1 mL of methanol (10 mL for grass hay, rice straw and WCRS)
- filtrated through hydrophilic PTFE membrane filter (pore size: 0.2 µm)

LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for fipronil

## 2.1.5 添加回収試験

2.1.2 の 3) のフィプロニル標準原液をメタノールで正確に希釈し添加に用いた。

フィプロニルとして WCRS に原物中に換算して 0.004 及び 0.11 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でそれぞれ 0.5 及び 12.5 ng/mL 相当量）になるようにそれぞれ添加してよく混合し、一夜静置した後に 2.1.4 の稲わらの定量法に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、添加は風乾物試料に対してフィプロニルとして 0.01 及び 0.25 mg/kg 相当量となるように行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して、原物（水分含有量 60 %）中濃度 = 風乾物（水分含有量 10 %）中濃度 / 2.25 の式により行った。

## 2.1.6 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の調製法の変更の影響

0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の調製法について、pH 調整に用いる試薬を「1 mol/L 塩酸又

は 1 mol/L 水酸化ナトリウム」から「リン酸 (1+10) 又は 1 mol/L 水酸化カリウム」に変更した影響について検討を行った。フィプロニルとして成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしにそれぞれ 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 10 ng/mL) , 小麦に 0.002 mg/kg 相当量 (同 2 ng/mL) 並びに乾牧草 (アルファルファ乾草) に 0.2 mg/kg 相当量 (同 10 ng/mL) になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後、2.1.4 の 1)に従って抽出し、液液分配に供する試料溶液を得た。得られた試料溶液について、1 mol/L 塩酸又は 1 mol/L 水酸化ナトリウムにより pH を調整した 0.5 mol/L リン酸緩衝液及びリン酸 (1+10) 又は 1 mol/L 水酸化カリウムにより pH を調整した 0.5 mol/L リン酸緩衝液を用いてそれぞれ 2.1.4 の 2)に従い液液分配を実施した。その後は本法に従って定量し、平均回収率を求めた。

## 2.2 共同試験

### 2.2.1 試料

フィプロニルが残留していないことを確認した成鶏飼育用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料、小麦、乾牧草 (アルファルファ乾草) 及び稲わらをそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。また、WCRS を 60 °C で 10 時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉砕した。これらについて、成鶏飼育用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料及び小麦は約 12 g ずつ、アルファルファ乾草、稲わら及び WCRS は約 6 g ずつ小分けしたもの (試料名は非明示) 各 2 袋を試験用試料として計 12 袋を各試験室に配付した。

なお、試験に用いた成鶏飼育用配合飼料及び肉用牛肥育用配合飼料の配合割合を Table 4 に示した。

Table 4 Compositions of the formula feed used in a collaborative study

Formula feed types	Ingredient types	Proportion	
		(%)	Ingredients
For layers	Grains	62	Corn, rice, bread crumbs
	Brans	3	Rice bran, wheat bran
	Oil seed meal	20	Soybean meal, corn gluten meal, rapeseed meal
	Animal by-products	3	Fish meal, swine meat and born meal
	Others	12	Vegetable oil, calcium carbonate, salt, calcium phosphate, feed additives
For beef cattle	Grains	50	Corn, barley
	Brans	32	Rice bran, wheat bran, barley bran
	Oil seed meal	13	Soybean meal, rapeseed meal
	Others	5	Alfalfa meal, beer yeast, molasses, sea weeds meal, calcium carbonate, salt, feed additives

### 2.2.2 試薬

1) アセトニトリル、アセトン及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用又はこれと同等以上のものを用いた。メタノールは LC-MS 用又はこれと同等以上のものを用いた。塩化ナトリウム、水酸化ナトリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム及び硫酸ナトリウム (無水) は試薬特級又はこれと同等以上のものを用いた。1 mol/L 酢酸アンモニウムは高速液体クロマ

トグラフ用又はこれと同等以上のものを用いた。水は超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）又は高速液体クロマトグラフ用を用いた。

2) フィプロニル標準原液

フィプロニル標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 99.4%）20 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてフィプロニル標準原液を調製した（この液 1 mL は，フィプロニルとして 0.2 mg を含有）。

3) フィプロニル標準液及び検量線作成用標準原液

フィプロニル標準原液 10 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加えて，1 mL 中にフィプロニルとして 10 µg を含有するフィプロニル標準液及び検量線作成用標準原液を調製した。

4) 成鶏飼育用配合飼料添加用標準液

3)で調製したフィプロニル標準液 2 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加え，1 mL 中にフィプロニルとして 100 ng を含有する成鶏飼育用配合飼料添加用標準液を調製した。

5) 肉用牛肥育用配合飼料添加用標準液

3)で調製したフィプロニル標準液 2 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加えたものからさらに 16 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，標線までメタノールを加え，1 mL 中にフィプロニルとして 16 ng を含有する肉用牛肥育用配合飼料添加用標準液を調製した。

6) 小麦添加用標準液

3)で調製したフィプロニル標準液 2 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加えたものからさらに 20 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，標線までメタノールを加え，1 mL 中にフィプロニルとして 20 ng を含有する小麦添加用標準液を調製した。

7) 乾牧草（アルファルファ乾草）添加用標準液

3)で調製したフィプロニル標準液 18 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加え，1 mL 中にフィプロニルとして 900 ng を含有する乾牧草（アルファルファ乾草）添加用標準液を調製した。

8) 稲わら添加用標準液

3)で調製したフィプロニル標準液 25 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加え，1 mL 中にフィプロニルとして 1250 ng を含有する稲わら添加用標準液を調製した。

9) WCRS 添加用標準液

3)で調製したフィプロニル標準液 25 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までメタノールを加え，1 mL 中にフィプロニルとして 1250 ng を含有する WCRS 添加用標準液を調製した。

3)の検量線作成用標準原液を 1 本，4)~9)を各 2 本，濃度は非通知で 2.2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。なお，1)の試薬については各試験室において準備した。

### 2.2.3 分析試料

2.2.1 の試験用試料を非明示の 2 点反復で用いた。フィプロニルとして，成鶏飼育用配合飼料

に 0.01 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して成鶏飼育用配合飼料添加用標準液 1 mL 添加）を，肉用牛肥育用配合飼料に 0.0016 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して肉用牛肥育用配合飼料添加用標準液 1 mL 添加）を，小麦に 0.002 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して小麦添加用標準液 1 mL 添加）を，乾牧草（アルファルファ乾草）に 0.18 mg/kg 相当量（試験用試料 5 g に対して乾牧草（アルファルファ乾草）添加用標準液 1 mL 添加）を，稲わらに 0.25 mg/kg 相当量（試験用試料 5 g に対して稲わら添加用標準液 1 mL 添加）を，WCRS に 0.25 mg/kg 相当量（試験用試料 5 g に対して WCRS 添加用標準液 1 mL 添加）を，分析開始の前日に添加して調製した。

#### 2.2.4 定量方法

2.1.4 によった。

#### 2.2.5 報告方法

分析値は，分析試料中濃度（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）で表し，4 桁目を四捨五入して有効桁数 3 桁まで報告させた。

#### 2.2.6 分析実施期間

令和 2 年 12 月 9 日から令和 3 年 1 月 8 日まで

#### 2.2.7 解析方法

結果の解析は，国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>10), 11)</sup>を参考に，Cochran 検定，single Grubbs 検定及び paired Grubbs 検定を行い，外れ値の有無を確認した上で平均回収率，繰返し精度（ $\text{RSD}_r$ ）及び室間再現精度（ $\text{RSD}_R$ ）を算出し，得られた  $\text{RSD}_R$  から，修正 Horwitz 式<sup>12)</sup>を用いて HorRat を求めた。

#### 2.2.8 参加試験室

ジューエルサイエンス株式会社，一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター，一般財団法人日本食品検査福岡検査所，一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，フィード・ワン株式会社研究所，独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，同札幌センター，同仙台センター，同名古屋センター及び同神戸センター（計 10 試験室）

### 3 結果及び考察

#### 3.1 追加検討

##### 3.1.1 稲わらについて開発した分析法の稲わら以外の飼料への適用の可否

矢野らが稲わらについて適用性を確認した分析法では，液液分配時に用いた 0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）を 0.5 w/v% 水酸化ナトリウム溶液に変更することにより良好な結果を得た。そこで，リン酸緩衝液で良好な結果が得られていた稲わら以外の飼料についても，稲わらの分析法が適用できるか検討を行ったが，液液分配の操作において試料液の粘性が上がり，液液分配後のカラム処理操作が困難となったことから，すべての飼料に稲わらの分析法を適用することは適当ではないと考えられた。しかしながら，稲わらが主原料となる WCRS については試料液の粘性が上がることなく分析が可能であり，フィプロニルの定量を妨げるピークや試料マトリックスによる影響も認められなかったことから，さらに添加回収試験を実施して稲わらの分析法の適用の可否を検討することとした。

##### 3.1.2 添加回収試験

2.1.5 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 5 のとおり，原物中 0.11 mg/kg の添加

濃度においては、平均回収率は 75.6 %、その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 5.5 % 以下の成績が得られ、飼料分析基準別表 3 の妥当性確認法ガイドライン<sup>4)</sup> (以下「妥当性確認法ガイドライン」という。) に定められた真度及び併行精度の目標値 (真度: 70 %以上 120 %以下, 精度: 21 %以下) を満たす良好な結果であった。しかし、原物中 0.004 mg/kg の添加濃度においては、平均回収率 60.6 %であり、目標値を満たすことはできなかった。このことから、WCRS に稲わらの分析法を適用することは適当ではないと考えられた。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

Table 5 Recoveries for fipronil

Sample	Spiked level (mg/kg as fed basis) <sup>a)</sup>	Recovery <sup>b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)
WCRS	0.004	60.6	4.9
	0.11	75.6	5.5

a) Fipronil was spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.01 and 0.25 mg/kg as air-dry basis for fipronil. The levels of fipronil as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

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

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

b) Mean ( $n = 5$ )

c) Relative standard deviation of repeatability

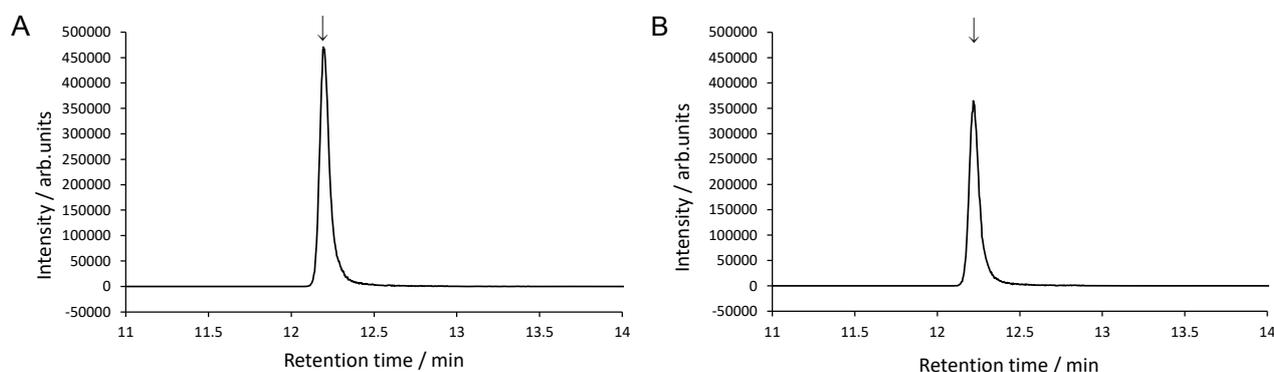


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring chromatograms of fipronil in standard and spiked sample solutions

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

A: Standard solution (10 ng/mL: 0.05 ng as fipronil)

B: Sample solution of WCRS (spiked at 0.11 mg/kg of fipronil (as 12.5 ng/mL in the sample solution))

### 3.1.3 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の調製法の影響

リン酸緩衝液の調製法の影響を確認するため 2.1.6 に従って添加回収試験を実施した。その結

果は Table 6 のとおり，妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値（真度：70 %以上 120 %以下）を満たしていたことから，本法においては 0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）の pH 調整はリン酸（1+10）又は 1 mol/L 水酸化カリウムを使用することとした。

Table 6 Effect of composition of phosphate buffer to the recovery of fipronil

Sample	Spiked level (mg/kg)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	
		HCl, NaOH	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , KOH
Formula feed for layers	0.01	89.7	88.9
Corn	0.01	85.7	89.3
Wheat	0.002	79.8	74.7
Alfalfa hay	0.2	85.1	88.4

a) Mean ( $n = 2$ )

### 3.2 共同試験

開発した分析法の室間再現精度を確認するため，2.2 により共同試験を実施した。

結果は Table 7-1 及び Table 7-2 のとおりであった。成鶏飼育用配合飼料，肉用牛肥育用配合飼料，小麦，乾牧草（アルファルファ乾草），稲わら及び WCRS について，平均回収率は 82.4，75.0，77.6，71.3，69.6 及び 68.8 %，RSD<sub>r</sub>は 6.2，8.2，7.0，3.5，3.0 及び 5.5 %，RSD<sub>R</sub>は 9.0，9.9，8.3，4.1，9.3 及び 8.0 %，HorRat は 0.41，0.45，0.38，0.19，0.44 及び 0.38 であり，妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値（成鶏飼育用配合飼料，肉用牛肥育用配合飼料，小麦及びアルファルファ乾草については 44 %以下，稲わら及び WCRS については 42 %以下）を満たしていた。HorRat については，すべての試料で 0.5 を下回ったが，分析操作が比較的簡便であるためと考えられた。

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

Table 7-1 Collaborative study for fipronil (1)

Lab. No.	Feed types					
	Formula feed for layers (mg/kg)		Formula feed for beef cattle (mg/kg)		Wheat (mg/kg)	
1	0.00957	0.00783	0.00116	0.00115	0.00144	0.00149
2	0.00733	0.00819	0.00116	0.00114	0.00145	0.00149
3	0.00901	0.00841	0.00123	0.00133	0.00170	0.00161
4	0.00782	0.00786	0.00137	0.00128	0.00156	0.00152
5	0.00754	0.00752	0.00118	0.00124	0.00130	0.00167
6	0.00782	0.00748	0.00119	0.00106	0.00158	0.00137
7	0.00897	0.00885	0.00124	0.000946	0.00168	0.00188
8	0.00729	0.00758	0.00108	0.00106	0.00150	0.00149
9	0.00887	0.00924	0.00122	0.00147	0.00160	0.00165
10	0.00920	0.00833	0.00127	0.00121	0.00155	0.00151
Spiked level (mg/kg)	0.01		0.0016		0.002	
No. labs <sup>a)</sup>	10		10		10	
No. outliers <sup>b)</sup>	0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.00824		0.00120		0.00155	
Mean recovery (%)	82.4		75.0		77.6	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	6.2		8.2		7.0	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	9.0		9.9		8.3	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	22		22		22	
HorRat	0.41		0.45		0.38	

a) Number of laboratories retained after the outliers were removed

b) Number of the removed outliers

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 7-2 Collaborative study for fipronil (2)

Lab. No.	Alfalfa hay		Rice straw		WCRS	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.129	0.123	0.158	0.158	0.172	0.175
2	0.130	0.135	0.167	0.164	0.169	0.163
3	0.136	0.130	0.172	0.170	0.160	0.174
4	0.148 <sup>a)</sup>	0.143 <sup>a)</sup>	0.199	0.182	0.184	0.182
5	0.125	0.127	0.150	0.163	0.167	0.154
6	0.122	0.132	0.198	0.199	0.183	0.182
7	0.125	0.117	0.162	0.162	0.176	0.146
8	0.134	0.129	0.161	0.167	0.160	0.148
9	0.152 <sup>a)</sup>	0.155 <sup>a)</sup>	0.193	0.196	0.195	0.187
10	0.133	0.127	0.182	0.178	0.189	0.173
Spiked level (mg/kg)	0.18		0.25		0.25	
No. labs <sup>b)</sup>	8		10		10	
No. outliers <sup>c)</sup>	2		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.128		0.174		0.172	
Mean recovery (%)	71.3		69.6		68.8	
RSD <sub>r</sub> <sup>d)</sup> (%)	3.5		3.0		5.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	4.1		9.3		8.0	
PRSD <sub>R</sub> <sup>f)</sup> (%)	22		21		21	
HorRat	0.19		0.44		0.38	

a) Data excluded by paired Grubbs test

b) Number of laboratories retained after the outliers were removed

c) Number of the removed outliers

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 8 Instruments used in the collaborative study

Lab.No	LC-MS/MS	LC column
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro premier XE, Waters	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
2	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Atlantis T3, Waters (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQD, Waters	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
6	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: QTRAP 4000, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
7	LC: LCMS-8060, Shimadzu MS/MS: LCMS-8060, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
8	LC: Alliance e2695, Waters MS/MS: Quattro Premier, Waters	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
9	LC: ExionLC AD, AB SCIEX MS/MS: TRIPLE QUAD 6500+, AB SCIEX	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
10	LC: 1260 Infinity II, Agilent Technologies MS/MS: 6470 Triple Quadrupole LC/MS, Agilent Technologies	Capcell Pak C18 MG II, OSAKA SODA (2.0 mm×150 mm, 3 μm)

#### 4 まとめ

飼料中に残留するフィプロニルについて、LC-MS/MSを用いた分析法を検討するとともに、共同試験を実施し、飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られ、収載が可能であると考えられた。

- 1) WCRS に原物中に換算してフィプロニルとして 0.004 及び 0.11 mg/kg 相当量を添加し、本法の稲わらの分析法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、0.004 mg/kg 相当量の添加濃度においては妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値を満たすことはできなかった。
- 2) 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の調製法によるフィプロニルの回収率への影響の有無について確認したところ、回収率への影響は認められなかった。
- 3) フィプロニルとして、肉用牛肥育用配合飼料に 0.0016 mg/kg 相当量、小麦に 0.002 mg/kg 相当量、乾牧草 (アルファルファ乾草) に 0.18 mg/kg 相当量、稲わらに 0.25 mg/kg 相当量、WCRS に 0.25 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 10 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。

## 謝 辞

共同試験に参加していただいたジューエルサイエンス株式会社，一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター，一般財団法人日本食品検査福岡検査所，一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，フィード・ワン株式会社研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会：農薬・動物用医薬品評価書 フィプロニル（第2版），平成28年4月（2016）.
- 2) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：農薬抄録  
<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/fipronil/index.htm>, cited 17 Jun. 2021.
- 3) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，農林省令第35号，昭和51年7月24日（1976）.
- 4) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和63年10月14日，63畜B第2050号（1988）.
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成20年4月1日，19消安第14729号（2008）.
- 6) 農林水産省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令，令和2年10月15日，農林水産省令71号（2020）.
- 7) 一般財団法人日本食品検査：平成29年度生産資材安全確保対策委託事業（飼料中の農薬分析法開発委託事業）（2018）.
- 8) 矢野 愛子，佐藤 憲大，土井 雄悟，榊原 良成：飼料中のクロルプロファム及びフィプロニルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発，飼料研究報告，**44**，57-74（2019）.
- 9) 矢野 愛子，佐藤 憲大，小野 雄造：飼料中のフィプロニルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発，飼料研究報告，**45**，18-27（2020）.
- 10) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 11) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 12) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

## 6 稲わら及び粃米中のヒドロキシイソキサゾールの液体クロマトグラフ質量分析計による分析法の共同試験

牧野 大作<sup>\*1</sup>, 土井 雄悟<sup>\*2</sup>, 田島 麻帆<sup>\*1</sup>

### Collaborative Study of Determination Method of Hydroxyisoxazol in Rice Straw and Paddy Rice for Feed by LC-MS

MAKINO Daisaku<sup>\*1</sup>, DOI Yugo<sup>\*2</sup> and TASHIMA Maho<sup>\*1</sup>

(\*<sup>1</sup> Fukuoka Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), \*<sup>2</sup> Fukuoka Regional Center, FAMIC (Now Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC))

We have conducted a collaborative study for validating a determination method of hydroxyisoxazol in rice straw and paddy rice for feed using a liquid-chromatograph electrospray-ionization mass spectrometer (LC-ESI-MS).

Having added water to a sample, hydroxyisoxazol was extracted with acetone, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then purified with liquid-liquid extraction, and the purified solution was injected into a LC-MS to determine the concentration of hydroxyisoxazol. LC separation was then carried out on a polymer column (MSPak GF-310 4D, 4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Showa Denko Inc.; Tokyo, Japan) using 0.1 v/v% formic acid solution-methanol (6:4) as a mobile phase. In the MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

A collaborative study was conducted by eight laboratories using rice straw and paddy rice, all of which were added with hydroxyisoxazol according to the following specifications: 0.5, 1 and 1.5 mg/kg for rice straw; 0.1, 0.25 and 1 mg/kg for paddy rice. The resulting mean recoveries ranged from 68.8 % to 78.5 %. The repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) were less than 6.3 % and less than 13 % respectively. The HorRat was less than 0.60.

This method was thus validated as useful for inspections of hydroxyisoxazol in rice straw and paddy rice for feed.

Key words: hydroxyisoxazol; liquid-chromatograph mass spectrometer (LC-MS); electrospray ionization (ESI); rice straw; paddy rice; collaborative study

キーワード：ヒドロキシイソキサゾール；液体クロマトグラフ質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；稲わら；粃米；共同試験

## 1 緒 言

ヒドロキシイソキサゾール（ヒメキサゾール）は、イソキサゾール骨格を有する土壌殺菌剤・植物生長調整剤である<sup>1)</sup>。国内での初回登録は1969年であり、稲をはじめとして、野菜や花き等幅広い植物に適用されている。厚生労働省の定める「食品、添加物等の規格基準」においては、玄米及び大豆で0.5 mg/kg、大麦、小麦及びライ麦等で0.02 mg/kgの基準値が定められている<sup>2)</sup>。飼料中のヒドロキシイソキサゾールについては、「飼料の有害物質の指導基準及び管理基準」において、稲

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

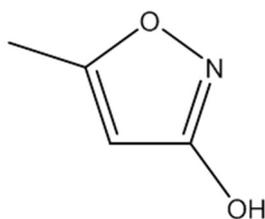
\*<sup>2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター，現 肥飼料安全検査部

わら中で 1 mg/kg, 粃米中で 0.5 mg/kg 及び稲発酵粗飼料中で 0.1 mg/kg の管理基準が設定されている<sup>3)</sup>.

ヒドロキシイソキサゾールの分析法としては, 厚生労働省通知試験法として高感度窒素リン検出器付きガスクロマトグラフ, アルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフ及びガスクロマトグラフ質量分析計を用いる方法<sup>4)</sup>が定められている. また, 環境省の排出水に係る標準分析方法に液体クロマトグラフ質量分析計(以下「LC-MS」という.)を用いる方法<sup>5)</sup>が定められている. 一方, 飼料中のヒドロキシイソキサゾールの分析法については飼料分析基準<sup>6)</sup>に記載されておらず, 分析法の確立が急務となっている.

そこで, 平成 29 年に矢野らは, 「平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業」において財団法人日本食品分析センターが開発した分析法<sup>7)</sup>を用いて, 稲わら及び粃米を対象に単一試験室内の妥当性確認を実施し, その結果を報告<sup>8)</sup>したところであるが, 更に今回, 共通試料を用いた共同試験を実施し, 飼料分析基準への記載の可否を検討したので, その概要を報告する.

参考にヒドロキシイソキサゾールの構造式を Fig.1 に示した.



5-Methylisoxazol-3-ol

C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub> MW: 99.1 CAS No.: 10004-44-1

Fig. 1 Chemical structure of hydroxyisoxazol

## 2 試験方法

### 2.1 試料

ヒドロキシイソキサゾールが残留していないことを確認した稲わら(2種類)及び粃米(3種類)をそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した. これらについて約 12 g ずつ小分けしたもの(試料名は非明示)各 2 袋(稲わら 1 種類については 4 袋)を試験用試料として計 12 袋を各試験室に配付した.

### 2.2 試薬

1) アセトン, ジエチルエーテル及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用又はこれと同等以上のものを用いた. メタノールは LC-MS 用又はこれと同等以上のものを用いた. ギ酸は液体クロマトグラフ用又はこれと同等以上のものを用いた. 塩化ナトリウム, 塩酸, 硫酸ナトリウム, 炭酸水素ナトリウムは試薬特級又はこれと同等以上のものを用いた. 水は超純水(JIS K0211 の 5218 に定義された超純水)又は市販の液体クロマトグラフ用を用いた.

#### 2) ヒドロキシイソキサゾール標準原液

ヒドロキシイソキサゾール標準品(和光純薬工業製, 純度 99.7%) 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてヒドロキシイソキサゾール標準原液を調製した(この液 1 mL は, ヒドロキシイソキサゾールとして 0.5

mg を含有) .

3) ヒドロキシイソキサゾール標準液

ヒドロキシイソキサゾール標準原液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加えて, ヒドロキシイソキサゾール標準液を調製した. (この液 1 mL 中は, ヒドロキシイソキサゾールとして 50  $\mu$ g を含有) .

4) 検量線作成用標準原液

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 10 mL を 500 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加えて, 検量線作成用標準原液を調製した (この液 1 mL は, ヒドロキシイソキサゾールとして 1  $\mu$ g を含有) .

5) 稲わら 1 添加用標準液 1

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとして 5  $\mu$ g を含有する稲わら 1 添加用標準液 1 を調製した.

6) 稲わら 1 添加用標準液 2

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 20 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとして 10  $\mu$ g を含有する稲わら 1 添加用標準液 2 を調製した.

7) 稲わら 2 添加用標準液

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 30 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとして 15  $\mu$ g を含有する稲わら 2 添加用標準液を調製した.

8) 粳米 1 添加用標準液

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 2 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとして 1  $\mu$ g を含有する粳米 1 添加用標準液を調製した.

9) 粳米 2 添加用標準液

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 5 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとして 2.5  $\mu$ g を含有する粳米 2 添加用標準液を調製した.

10) 粳米 3 添加用標準液

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 20 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとして 10  $\mu$ g を含有する粳米 3 添加用標準液を調製した.

4)を 1 本並びに 5)~10)を各 2 本, 濃度は非通知で 2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した. なお, 1)の試薬については各試験室において準備した.

### 2.3 分析試料

2.1 の試験用試料を非明示の 2 点反復で用いた. ヒドロキシイソキサゾールとして稲わら 1 に 0.5 mg/kg 相当量 (試験用試料 10 g に対して稲わら 1 添加用標準液 1 mL 添加) を, 稲わら 1 に 1 mg/kg 相当量 (試験用試料 10 g に対して稲わら 1 添加用標準液 2 mL 添加) を, 稲わら 2 に

1.5 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して稲わら 2 添加用標準液 1 mL 添加）を，粃米 1 に 0.1 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して粃米 1 添加用標準液 1 mL 添加）を，粃米 2 に 0.25 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して粃米 2 添加用標準液 1 mL 添加）を，粃米 3 に 1 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して粃米 3 添加用標準液 1 mL 添加）を，分析開始の直前に添加して調製した。

#### 2.4 定量方法

矢野らの方法<sup>8)</sup>によった。

#### 2.5 報告方法

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

#### 2.6 分析実施期間

令和 2 年 12 月 1 日から令和 3 年 1 月 31 日まで

#### 2.7 解析方法

結果の解析は，国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>9), 10)</sup>を参考に，Cochran 検定，single Grubbs 検定及び paired Grubbs 検定を行い，外れ値の有無を確認した上で平均回収率，繰返し精度（RSD<sub>f</sub>）及び室間再現精度（RSD<sub>R</sub>）を算出し，得られた RSD<sub>R</sub> から，修正 Horwitz 式<sup>11)</sup>を用いて HorRat を求めた。

### 3 参加試験室

一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター，独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，同札幌センター，同仙台センター，同名古屋センター，同神戸センター及び同福岡センター（計 8 試験室）

### 4 結果と考察

ヒドロキシイソキサゾールの結果は Table 1-1 及び 1-2 のとおりであり，稲わら 1（0.5 mg/kg 相当量添加），稲わら 1（1 mg/kg 相当量添加），稲わら 2，粃米 1，粃米 2 及び粃米 3 について，平均回収率は 69.9，68.8，69.2，78.5，78.3 及び 77.9%，RSD<sub>f</sub> は 4.4，3.9，4.0，6.1，5.2 及び 6.3%，RSD<sub>R</sub> は 9.6，7.9，9.6，13，9.0 及び 9.9%，HorRat は 0.51，0.47，0.60，0.60，0.44 及び 0.60 であった。飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた室間再現精度の目標値（稲わら 1（0.5 mg/kg 相当量添加）については 38%以下，稲わら 1（1 mg/kg 相当量添加）については 34%以下，稲わら 2 については 32%以下，粃米 1 については 44%以下，粃米 2 については 40%以下，粃米 3 については 34%以下）を満たす良好な結果が得られた。HorRat については，0.5 を下回るものが見られたが，特に分析手法等に問題は認められなかった。

参考のため，各試験室で使用した LC-MS（液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を LC-MS として使用したものを含む）の機種等を Table 2 に示した。また，LC カラムは全ての試験室で MSPak GF-310 4D（昭和電工製，4.6 mm×150 mm，5 μm）を使用した。

Table 1-1 Collaborative study for hydroxyisoxazol (1)

Lab. No.	Rice straw 1		Rice straw 1		Rice straw 2	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.382	0.362	0.712	0.722	1.10	1.12
2	0.420	0.367	0.723	0.735	1.04	1.13
3	0.321	0.331	0.734	0.704	0.988	1.03
4	0.369	0.356	0.714	0.721	1.01	1.03
5	0.315	0.301	0.681	0.620	0.997	0.886
6	0.367	0.366	0.726	0.751	1.08	1.09
7	0.360	0.358	0.581	0.660	1.20	1.15
8	0.301	0.314	0.616	0.614	0.902	0.860
Spiked level (mg/kg)	0.5		1		1.5	
No. labs <sup>a)</sup>	8		8		8	
No. outliers <sup>b)</sup>	0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.349		0.688		1.04	
Mean recovery (%)	69.9		68.8		69.2	
RSD <sub>F</sub> <sup>c)</sup> (%)	4.4		3.9		4.0	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	9.6		7.9		9.6	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	19		17		16	
HorRat	0.51		0.47		0.60	

a) Number of laboratories retained after the outliers were removed

b) Number of the removed outliers

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 1-2 Collaborative study for hydroxyisoxazol (2)

Lab. No.	Paddy rice 1		Paddy rice 2		Paddy rice 3	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0815	0.0826	0.215	0.208	0.782	0.807
2	0.0822	0.0730	0.220	0.194	0.882	0.906
3	0.0895	0.102	0.172	0.178	0.836	0.675
4	0.0930	0.0856	0.210	0.226	0.778	0.688
5	0.0735	0.0665	0.176	0.175	0.711	0.737
6	0.0720	0.0719	0.189	0.191	0.772	0.772
7	0.0699	0.0720	0.201	0.197	0.877	0.851
8	0.0681	0.0720	0.177	0.202	0.675	0.719
Spiked level (mg/kg)	0.1		0.25		1	
No. labs <sup>a)</sup>	8		8		8	
No. outliers <sup>b)</sup>	0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.0785		0.196		0.779	
Mean recovery (%)	78.5		78.3		77.9	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	6.1		5.2		6.3	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	13		9.0		9.9	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	22		20		17	
HorRat	0.60		0.44		0.60	

a) Number of laboratories retained after the outliers were removed

b) Number of the removed outliers

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 2 Instruments used in the collaborative study

Lab.No	LC-MS
1	LC: Prominence, Shimadzu MS: LCMS-2010EV, Shimadzu
2	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS: ACQUITY TQD, Waters
3	LC: Prominence, Shimadzu MS: LCMS-2010EV, Shimadzu
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS: Quattro premier XE, Waters
5	LC: Prominence, Shimadzu MS: LCMS-2010EV, Shimadzu
6	LC: Nexera X2, Shimadzu MS: LCMS-8040, Shimadzu
7	LC: Prominence, Shimadzu MS: LCMS-8060, Shimadzu
8	LC: ExionLC AD, SCIEX MS: TRIPLE QUAD 6500+, SCIEX

## 5 まとめ

稲わら及び粃米に残留するヒドロキシイソキサゾールについて、稲わらにヒドロキシイソキサゾールとしてそれぞれ 0.5, 1 及び 1.5 mg/kg 相当量を、粃米にヒドロキシイソキサゾールとしてそれぞれ 0.1, 0.25 及び 1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 8 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たす良好な結果が得られ、飼料分析基準への収載が可能であると考えられた。

## 謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センターにおける関係者各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 環境省中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会（第 43 回）：水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準として環境大臣が定める基準の設定に関する資料，平成 26 年 12 月 17 日 (2014).
- 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，第 370 号 (1959).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005).

- 5) 環境庁水質保全局長通知：ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針，平成 2 年 5 月 24 日，環水土第 77 号 (1990).
- 6) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 7) 財団法人日本食品分析センター：平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 (2009).
- 8) 矢野 愛子，榊原 良成：稲わら及び粃米中のヒドロキシイソキサゾールの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の開発，飼料研究報告，43，36-47 (2018).
- 9) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995).
- 10) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 11) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, 125, 385-386 (2000).

## 7 カルタップの液体クロマトグラフ質量分析計による分析法の適用範囲をイアコーンサイレージに拡大するための妥当性確認

関口 好浩<sup>\*1</sup>, 板橋 葵<sup>\*2</sup>

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

SEKIGUCHI Yoshihiro<sup>\*1</sup> and ITABASHI Aoi<sup>\*2</sup>

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

(Now Nagoya Regional Center, FAMIC), \*<sup>2</sup> Kobe Regional Center, FAMIC

(Now Fertilizer and Feed Inspection Department))

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

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

Whereas a recovery test was conducted on ECS where cartap was added with 175 μg/kg, the resulting mean recovery was low (28.3 %). Since low recovery results were similarly obtained for corn as well, the cause unfolding test for this was performed using corn. The test result indicated that the main causes of the low recovery rate might have been evaporation/dryness of hexane solution and ionization inhibition at mass spectrometry. Therefore, a further recovery test for corn was conducted with the application of different evaporation pressures, but no improvement was observed in the recoveries.

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

**キーワード:** カルタップ; ネライストキシン; 液体クロマトグラフ質量分析計; エレクトロスプレーイオン化法; イアコーンサイレージ; とうもろこし

## 1 緒 言

カルタップは、武田薬品工業が開発したネライストキシンをリード化合物とする殺虫剤であり、国内では 1967 年に初回農薬登録されている<sup>1)</sup>。国内における飼料中の残留基準値（カルタップ、ベンスルタップをカルタップ含量に換算したもの及びチオシクロラムをカルタップ含量に換算したものの総和）は、えん麦、大麦、小麦、とうもろこし、マイロ及びライ麦で 0.2 mg/kg 並びに牧草で

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

<sup>\*2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター，現 肥飼料安全検査部

0.7 mg/kg と定められている<sup>2)</sup>。

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

近年、食料自給率向上の重点的な施策の取組の一つとしてイアコンサイレンジ（とうもろこしの子実、芯及び外皮から調製したサイレンジ。以下「ECS」という。）の生産及び利用が推進されているところである。しかしながら、カルタップ分析法は、ECSにおける妥当性が確認されておらず、カルタップの残留実態が把握できない状況にある。そこで、カルタップ分析法のECSへの適用の可否を検討したので概要を報告する。

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

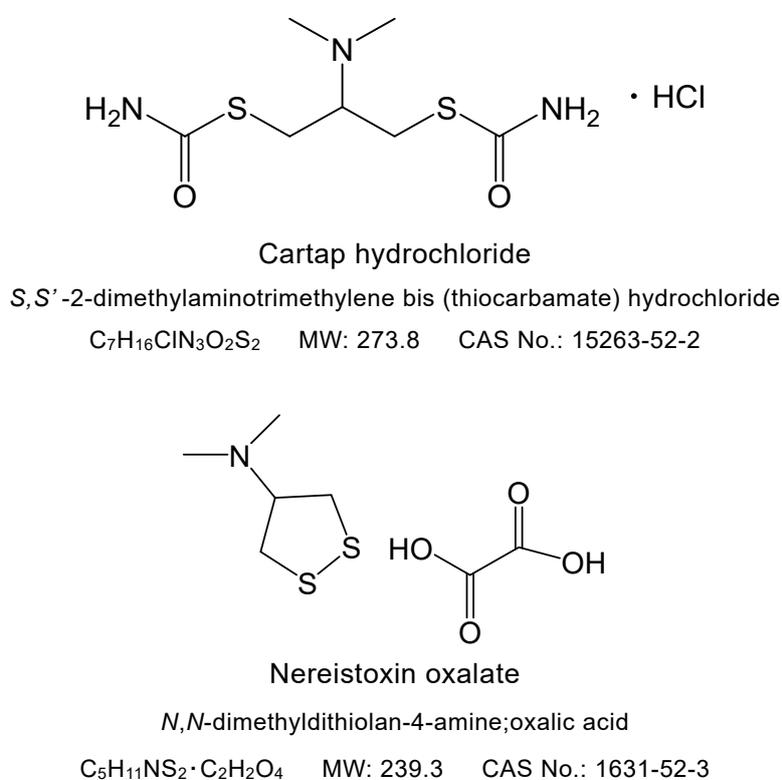


Fig. 1 Chemical structures of cartap hydrochloride and nereistoxin oxalate

## 2 実験方法

### 2.1 試料

ECSの分析用試料は、次のとおり調製した。とうもろこしの雌穂（完熟期）を1本毎にスクリーンを装着していないカッティングミル1で細断し、大きめに残った芯及び穂皮を更におおむね2 cm未満となるようにはさみで細断した。細断した雌穂5本分を1つの袋に収めて均質化した後、2つの密封用袋に分けた。バキュームシーラーを用いて脱気し密封後、28℃で36日間貯蔵し、ECSとした。ECSを60℃で6時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、それぞれ目開き1 mmのスクリーンを装着したカッティングミル2で粉碎し、分析用試料とした。

低回収率の原因究明に用いたとうもろこし（子実のみ）は、ECSに用いたとうもろこしとは別

のものを、目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し、分析用試料とした。

## 2.2 試薬

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

2) ヘプタフルオロ酪酸溶液

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

3) ネライストキシシン標準液

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

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

試料への添加に当たっては，ネライストキシシン標準原液をメタノールで正確に希釈し，試料へ添加後，よく混合した。

4) カルタップ標準原液

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

試料への添加には，カルタップ標準原液をメタノールで正確に希釈したのを用いた。

5) 抽出溶媒

使用時に，L-システイン塩酸塩一水和物 10 g を塩酸（1+100）に溶かして 1 L とした。

6) 塩化ニッケル溶液

塩化ニッケル（II）（無水）2 g を水に溶かして 100 mL とした。

## 2.3 装置及び器具

1) カッティングミル：

カッティングミル 1：SM-100 Retsch 製（回転数（仕様）1430 rpm）

カッティングミル 2：SM-2000 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，回転数（仕様）835 rpm）

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

3) 振とう機：MW-DRV 宮本理研工業製（使用時振動数 300 rpm）

4) 多孔性ケイソウ土カラム：Chem Elut（50 mL 保持用）Agilent Technologies 製

## 5) LC-MS :

LC 部 : Prominence 島津製作所製

MS 部 : LCMS-2010EV 島津製作所製

## 2.4 定量方法

## 1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液 20 mL を 200 mL の共栓三角フラスコに正確に入れ、アルカリ加水分解に供する試料溶液とした。

## 2) アルカリ加水分解

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

## 3) カラム処理

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに入れ 10 分間静置した。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていた三角フラスコをヘキサン 10 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加えた。液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下させてネライストキシシンを溶出させ、更にヘキサン 120 mL をカラムに加えて同様に溶出させた後、溶出液にアセトノーゼエチレングリコール (49+1) 0.5 mL を加えた。溶出液を 37 °C 以下の水浴で約 2 mL まで減圧濃縮した後、乾固するまで静置した。ヘプタフルオロ酪酸溶液-メタノール (4+1) 4 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を LC-MS による測定に供する試料溶液とした。

## 4) LC-MS による測定

試料溶液及び各ネライストキシシン標準液各 2 µL を LC-MS に注入し、選択イオン検出 (以下「SIM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 に示した。

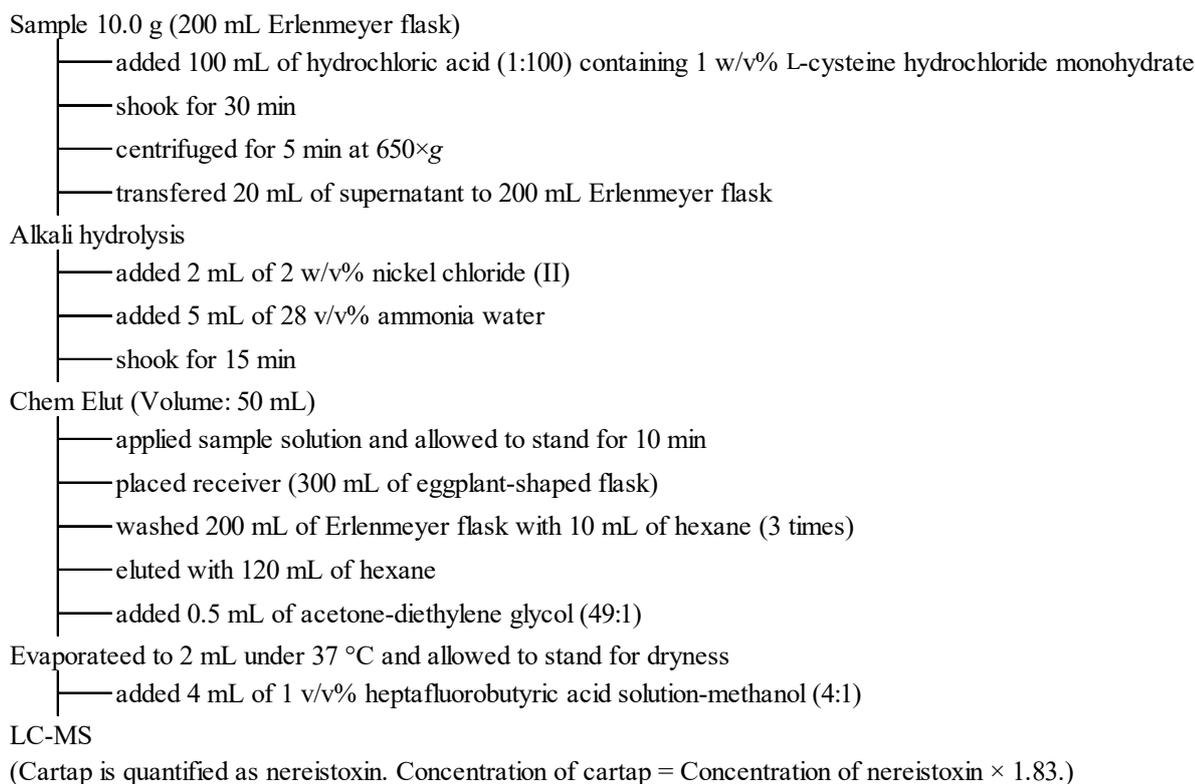
Table 1 Operation conditions of LC-MS

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

## 5) 計算

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

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for cartap

## 2.5 予備検討

ECS について、カルタップを原物換算して 175 µg/kg 相当量（最終試料溶液中でネライストキシンとして 55 ng/mL）になるように添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、添加は風乾物試料に対してカルタップとして 200 µg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 30 %及び 20 %と想定して、原物（水分含有量 30 %）中濃度 = 風乾物（水分含有量 20 %）中濃度 / 1.14 の式により行った。

とうもろこしについても、カルタップを 200 µg/kg 相当量（最終試料溶液中でネライストキシンとして 55 ng/mL）になるように添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

## 2.6 低回収率の原因究明

低回収率の原因究明を行うため、下記の試験を神戸センターと本部で実施した。

### 1) 標準液の劣化の確認

とうもろこしにネライストキシン標準原液を 400 µg/kg 相当量（カルタップとして 732 µg/kg 相当量。最終試料溶液中でネライストキシンとして 200 ng/mL）になるように添加後よく混合し、2.4 に従って定量した。

### 2) 各操作の確認

次の試料溶液をそれぞれ調製し、2.4 に従って定量した。なお、カルタップ及びネライストキシンの添加は、それぞれ 2.2 の 3)及び 4)の標準液を用いた。

- i) とうもろこしにカルタップを 200 µg/kg 相当量（最終試料溶液中でネライストキシシンとして 55 ng/mL）になるように添加後よく混合し，2.4 に従って調製したもの。
- ii) とうもろこし 20 g に抽出溶媒 200 mL を添加し，2.4 に従って調製したもの。
- iii) ii)の遠心分離後の上澄み液 20 mL に，カルタップを 200 µg/kg 相当量（同 55 ng/mL）になるように添加後よく混合し，2.4 に従って調製したもの。
- iv) ii)のアルカリ加水分解液に，ネライストキシシンをカルタップとして 200 µg/kg 相当量（同 55 ng/mL）になるように添加後よく混合し，2.4 に従って調製したもの。
- v) ii)のケイソウ土カラムからの溶出液に，ネライストキシシンをカルタップとして 200 µg/kg 相当量（同 55 ng/mL）になるように添加後よく混合し，2.4 に従って調製したもの。
- vi) ii)で調製した試料溶液に，ネライストキシシンをカルタップとして 200 µg/kg 相当量（同 55 ng/mL）になるように添加後よく混合したもの。

本部においては，とうもろこしは神戸センターとは別のものを用い，LC-MS は神戸センターと同機種，カルタップ標準原液，ネライストキシシン標準原液及び LC-MS のカラムは同一のものを用いた。

### 2.7 減圧濃縮操作の確認

とうもろこし 20 g に抽出溶媒 200 mL を添加して 2.4 に従ってカラム処理まで行った後，ネライストキシシンをカルタップとして 200 µg/kg 相当量（最終試料溶液中でネライストキシシンとして 55 ng/mL）添加し，よく混合した後，圧力条件を 250 hPa，280 hPa 及び 290 hPa の 3 通りで減圧濃縮を行い，2.4 に従って定量した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 予備検討

2.5 により予備検討を行った。その結果は Table 2 のとおり，平均回収率が 28.3 %と低い回収率であった。手技等に問題がないかを確認するために，既に妥当性確認されているとうもろこしについても試験を行ったところ，34.4 %と同様に低い回収率であった。

Table 2 Results of preliminary test

Sample	Spiked level (as cartap) (µg/kg)	Recovery <sup>a)</sup> (%)
ECS	200 <sup>b)</sup>	28.3
Maize	200	34.4

a) Mean ( $n = 2$ )

b) Spiked level as air-dried basis

### 3.2 低回収率の原因究明

既に妥当性が確認されているとうもろこしでも低回収率であったことから，試料である ECS が原因ではなく，手技等に原因があると考えられたため，とうもろこしを用いて 2.6 に従い原因究明を行った。試験室特有の要因によるものかを確認するため，本部でも同様の試験を行った。その結果は Table 3 のとおりであった。

減圧濃縮前及び最終試料溶液に添加した場合に回収率が大きく低下していることから，減圧濃

縮・乾固時の損失及びイオン化阻害が低回収率の主な原因と考えられた。また、抽出溶媒添加前にカルタップを添加した場合でも回収率が低くなる傾向が認められたことから、抽出時の試料への吸着の影響も考えられた。

ネライストキシン標準原液を抽出溶媒添加前に添加した場合と、アルカリ加水分解前にカルタップ標準液を添加した場合やカラム処理前にネライストキシン標準液を添加した場合とを比較して回収率が近かったことから、3.1 の添加に用いたカルタップ標準液に分析操作中の劣化はないものと考えられた。

本部でも同様の結果が得られたことから、低回収率の原因は、試験室特有の要因ではないことが裏付けられた。

Table 3 Cause unfolding results of low recovery

Stage of spike	Standard solution	Spiked level as cartap ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ equivalent)	Recovery (%)	
			Kobe regional center <sup>a)</sup>	Headquarters <sup>b)</sup>
Before adding extraction solution	Nereistoxin	732	57.8	57.6
Before adding extraction solution	Cartap	200	44.1	50.1
Before alkali hydrolysis	Cartap	200	50.1	55.4
Before Chem Elut treatment	Nereistoxin	200	57.2	48.8
Before evaporation	Nereistoxin	200	59.4	55.0
Final sample solution	Nereistoxin	200	77.9	64.3
Not spiked	—	—	ND <sup>c)</sup>	ND <sup>c)</sup>

a) Mean ( $n = 2$ )

b)  $n = 1$

c) Not detected

### 3.3 減圧濃縮操作の確認

3.2 において、減圧濃縮・乾固の段階の損失が低回収率の原因の一つとして考えられたことから、2.7 に従い、減圧濃縮前にネライストキシンを添加し減圧条件の確認を行った。前項までの検討は減圧濃縮を 37 °C 以下 280 hPa<sup>4)</sup> で実施したことから、温度は 35 °C で圧力を 280 hPa の他に 250 hPa 並びに 290 hPa の 3 通りを確認した。その結果は Table 4 のとおり、減圧濃縮時の圧力を変えても回収率は 50 % 程度と低回収率のままであった。

Table 4 Recoveries at various pressure conditions of evaporation

Pressure condition (hPa)	Recovery <sup>a)</sup> (%)
250	55.8
280	56.8
290	52.8

$n = 1$

a) 55  $\mu\text{g}/\text{kg}$  equivalent of nereistoxin was spiked after Chem Elut treatment.

## 4 まとめ

ECSに残留するカルタップについて、飼料分析基準による方法の適用の可否について検討したところ、以下の結果が得られ、低回収率の改善の検討が必要であることが分かった。

- 1) ECSについて、予備検討として添加回収試験を行ったところ、28.3%と低回収率の結果が得られた。とうもろこしについても同様に低回収率の結果が得られた。
- 2) とうもろこしを用いた原因究明を行った結果、減圧濃縮・乾固時の損失及びLC-MS測定時のイオン化阻害が主な原因として考えられた。
- 3) とうもろこしを用いてカラム処理後にネライストキシンを添加し、減圧条件を確認した結果、圧力を280 hPaから250 hPa又は290 hPaに変更しても、回収率の改善は認められなかった。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会農薬専門調査会：カルタップ農薬評価書，令和元年6月(2016)。
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和51年7月24日，農林省令第35号(1976)。
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成20年4月1日，19消安第14729号(2008)。
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成17年度飼料の有害物質等残留基準設定等委託事業（分析法の開発） 飼料中の有害物質等の分析法の開発，3-134(2006)。

**調査資料****1 飼料中の有害物質等のモニタリング等の結果について（令和2年度）****Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2020)**

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課  
飼料鑑定第二課

**1 目 的**

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という．）では、飼料等の使用が原因となって、有害畜産物（家畜等の肉、乳、その他の食用に供される生産物で人の健康をそこなうおそれがあるもの）が生産され、又は家畜等に被害が生じることにより畜産物の生産が阻害されることを防止する見地から、農林水産省が毎年定めている「食品の安全性に関する有害化学物質のサーベイランス・モニタリング年次計画」等に基づき、法令等で定められている基準値等の適合状況のモニタリング及び基準値等が設定されていない有害物質等の含有実態を把握するためのサーベイランス（以下「モニタリング等」という．）を実施している．今回、令和2年度のモニタリング等の結果を取りまとめたので報告する．

**2 方 法****2.1 モニタリング等の対象試料**

令和2年4月から令和3年3月までの間に、農林水産省（地方農政局等）が飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律<sup>1)</sup>（以下「飼料安全法」という．）第56条の規定に基づき、港湾サイロに対して立入検査を実施した際に収去した飼料、FAMIC 肥飼料安全検査部、札幌センター、仙台センター、名古屋センター、神戸センター及び福岡センターが、飼料安全法第57条の規定に基づき、単体飼料工場、配混合飼料工場、港湾サイロ等に対して立入検査を実施した際に採取した飼料等並びにサーベイランスに協力いただいた飼料製造事業場において採取した飼料を対象とした．

モニタリング等の対象とした試料及び点数を表1に示した．

**2.2 モニタリング等の対象成分**

飼料安全法第3条第1項の規定に基づき、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令<sup>2)</sup>（以下「成分規格等省令」という．）において、飼料中の有害物質等の成分規格（以下「省令基準値」という．）が定められている．また、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準<sup>3)</sup>において、飼料中の有害物質等の指導基準値及び管理基準値（以下「指導基準値等」という．）が定められている．各試料に対するモニタリング等実施成分は、これらの基準値の他、飼料の原産国、過去の検出実態等を勘案するとともに、配混合飼料の対象家畜等、使用されている原料等にも留意して以下のとおり選定した．

## 1) 有害物質

## i かび毒（24成分）

## ア 指導基準値等が定められているもの（4成分）

とうもろこし又は配混合飼料に指導基準値又は管理基準値が定められているアフラトキシン B<sub>1</sub>、ゼアラレノン、デオキシニバレノール及びフモニシン（B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>及びB<sub>3</sub>の総和、以下同じ。）を対象とした。

## イ ア以外のかび毒等（20成分）

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

かび毒：アフラトキシン B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、ステリグマトシスチン、HT-2 トキシシン、T-2 トキシシン、ネオソラニオール、フザレノン-X、3-アセチルデオキシニバレノール、15-アセチルデオキシニバレノール、ニバレノール、ジアセトキシスシルペノール、デオキシニバレノール-3-グルコシド、オクラトキシシン A、シトリニン、 $\alpha$ -ゼアララノール、 $\beta$ -ゼアララノール、ゼアララノン、 $\alpha$ -ゼアラレノール及び $\beta$ -ゼアラレノール

## ii 重金属等（4成分）

管理基準値が定められているカドミウム、水銀、鉛及びヒ素を対象とした。

## iii 農薬（122成分）

## ア 省令基準値が定められているもの

成分規格等省令別表第1の1の(1)に省令基準値が定められている農薬61成分のうちの33成分を対象とした。

## イ ア以外の農薬

飼料分析基準に方法が規定されている農薬のうちの89成分を対象とした。

## 2) BSE 発生防止に係る成分

## i 動物由来たん白質

成分規格等省令別表第1の2に規定された牛等を対象とする飼料、動物由来たん白質又は動物由来たん白質を原料とする飼料中のほ乳動物等由来たん白質を対象とした。

## ii 不溶性不純物

成分規格等省令別表第1の5の(1)に規定された動物性油脂を対象とした。

## 3) 病原微生物（サルモネラ）

配混合飼料及び単体飼料を対象とした。

表1 モニタリング等を実施した試料及び点数

モニタリング等の対象試料		項目別の試料点数								
		有害物質			BSE発生防止に係る試験			病原微生物		
		かび毒	重金属	農薬	動物由来たん白質			不溶性不純物	サルモネラ	
顕微鏡鑑定	ELISA試験				PCR試験					
種類	試料点数									
	中すう育成用配合飼料	2	2	1	1					1
	成鶏飼育用配合飼料	20	16	9	10					3
	ブロイラー肥育前期用配合飼料	5	5	1	1					
	ブロイラー肥育後期用配合飼料	6	6		2					1
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	7	7	1	5					3
	子豚育成用配合飼料	6	5	2	3					3
	肉豚肥育用配合飼料	11	11	7	5					7
	種豚育成用配合飼料	1	1		1					1
	種豚飼育用配合飼料	7	7		1					1
	豚複数ステージ用	2	2	2	2					2
配 混 合 飼 料	若令牛育成用配合飼料	6	5	1	1	5	5	5		3
	乳用牛飼育用配合飼料	16	13	3	7	16	13	13		7
	幼令肉用牛育成用配合飼料	1	1							
	肉用牛肥育用配合飼料	19	14	5	9	16	15	15		5
	肉牛繁殖用配合飼料	5	5		1	3	3	3		
	種牛飼育用配合飼料	1	1		1	1	1	1		
	牛複数ステージ用	8	7	1	5	6	4	4		1
	養殖水産動物用	33		33						
	大麦・とうもろこし二種混合飼料	1	1		1	1	1	1		1
	動物性たん白質混合飼料	1				1	1	1		
	フィッシュソリュブル吸着飼料	1				1	1	1		1
	糖蜜吸着飼料	2				2	2	2		1
	上記以外の混合飼料	28	3	1	2	28	28	28		5
	小 計	189	112	67	58	80	74	74		46
穀 類	グレインソルガム (マイロ)	3	3		3					
	小麦	1	1		1					
	小麦粉	1	1		1					
	末粉	4	4		2					
	とうもろこし	34	34		34					
	小 計	43	43		41					
そ う こ う 類	大麦外皮	1	1		1					
	米ぬか	2	2		2					
	米ぬか油かす	3	2		3					1
	コーングルテンフィード	15	15		11					
	雑穀酒かす	1	1		1					
	しょう油かす	1	1		1					
	大豆皮	4	4		4					
	とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル (DDGS)	22	22		16					
	ふすま	23	23		20					
	ホミネーフィード	7	7		3					
	麦ぬか	12	12		10					
	小 計	91	90		72					1

表1 モニタリング等を実施した試料及び点数（続き）

モニタリング等の対象試料		項目別の試料点数							
		有害物質			BSE発生防止に係る試験			病原微生物	
		かび毒	重金属	農薬	動物由来たん白質			不溶性不純物	サルモネラ
顕微鏡鑑定	ELISA試験				PCR試験				
種類	試料点数								
植物性油かす類	加糖加熱大豆油かす	1	1	1					
	コーングルテンミール	11	11	6					
	コーンジャムミール	8	8	3					
	大豆油かす	27	27	25					1
	なたね油かす	8	8	8					
	パーム油かす	1		1					
	やし油かす	2	2	2					
小計	58	57	46					1	
動物性飼料	イカ内臓溶解液	1			1	1	1		
	チキンミール	18			18	18	18		14
	魚介類すり身	1			1	1	1		1
	魚粉	32		6	32	32	32		22
	原料混合肉骨粉（ポークチキンミール）	20		1		20	20		12
	肉骨粉（ポークミール）	2				2	2		2
	フェザーミール	9			9	9	9		2
小計	83		7		61	83	83	53	
乾牧草	稲わら	1		1					
	オーツヘイ	2		2					
	クレイングラス	1		1					
	スーダングラス	4		3					
	チモシー	1		1					
	小計	9		8					
その他	カカオ豆殻	1	1	1					
	乾燥酵母細胞壁	1			1	1	1		
	キャッサバ	1	1						
	酵母菌培養物	1			1	1	1		
	コーンコブミール	2	2	1					
	飼料用酵母	1			1	1	1		
	動物性油脂	44						44	
	パイナップルかす	2	2	1					
	ビートパルプ	9	9	6					
	綿実	1	1	1					
	小計	63	16	10		3	3	3	44
	合計	536	318	82	236	144	160	160	44

## 2.3 サンプリング方法等

## 1) 有害物質及び病原微生物の分析用試料

試料は、飼料等検査実施要領<sup>5)</sup>により、採取、保管した。とうもろこし及び牧草は、飼料中の農薬の検査に係る通知<sup>6)</sup>により、採取した。

分析用試料は、飼料分析基準第2章の規定により調製した。

## 2) 動物由来たん白質等の分析用試料

試料は、飼料分析基準第 16 章第 1 節の規定により、採取、保管及び調製した。

## 3) 不溶性不純物の分析用試料

基準油脂分析試験法<sup>7)</sup>の試料採取方法に準拠した次の方法<sup>8)</sup>により採取した。

動物性油脂を積み込んだタンクローリー車の上部のふたを開け、ポンプサンプラー（容量約 300 mL）を用いてハッチの上部、中部及び下部の 3 箇所から動物性油脂を採取し、これらを混合して試料とした。

## 2.4 試験方法

## 1) 有害物質

## i かび毒

飼料分析基準第 5 章に規定された方法により実施した。

## ii 重金属等

飼料分析基準第 4 章第 1 節に規定された方法により実施した。

## iii 農薬

飼料分析基準第 6 章に規定された方法により実施した。

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

## 2) 飼料への動物由来たん白質等の混入確認

以下の 3 法を併用して実施した。なお、混入確認の結果は、牛を対象とする飼料の抽出検査の取扱いに係る事務連絡<sup>9)</sup>の判定手順（例）（以下「混入確認判定手順」という。）に基づき、総合的に判定した。

## i 顕微鏡鑑定

飼料分析基準第 19 章 1.1 比重選別及び 1.2 顕微鏡検査を応用した鑑定方法<sup>10)</sup>により、獣骨（肉骨粉由来組織）の有無を確認した。鑑定方法の概要を図 1 に示した。

## ii ELISA 試験

飼料分析基準第 17 章第 2 節 1.1 の(3)に規定された方法により実施した。

## iii PCR 試験

牛用配混合飼料は、飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 に規定された方法により、ほ乳動物由来 DNA を対象に混入の有無を確認した。魚粉等、チキンミール等、肉骨粉等及び輸入飼料は、飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.2 に規定された方法により、反すう動物由来 DNA を対象に混入の有無を確認した。なお、乳製品等が原料として使用又は混入の可能性のある試料は、飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 付記に規定された方法により、乳製品等除去処理を行った後、上記試験を実施した。

## 3) 不溶性不純物

成分規格等省令別表第 1 の 5 の (1) のアに規定された方法により実施した。

## 4) サルモネラ

飼料分析基準第 18 章 1 に規定された方法により実施した。

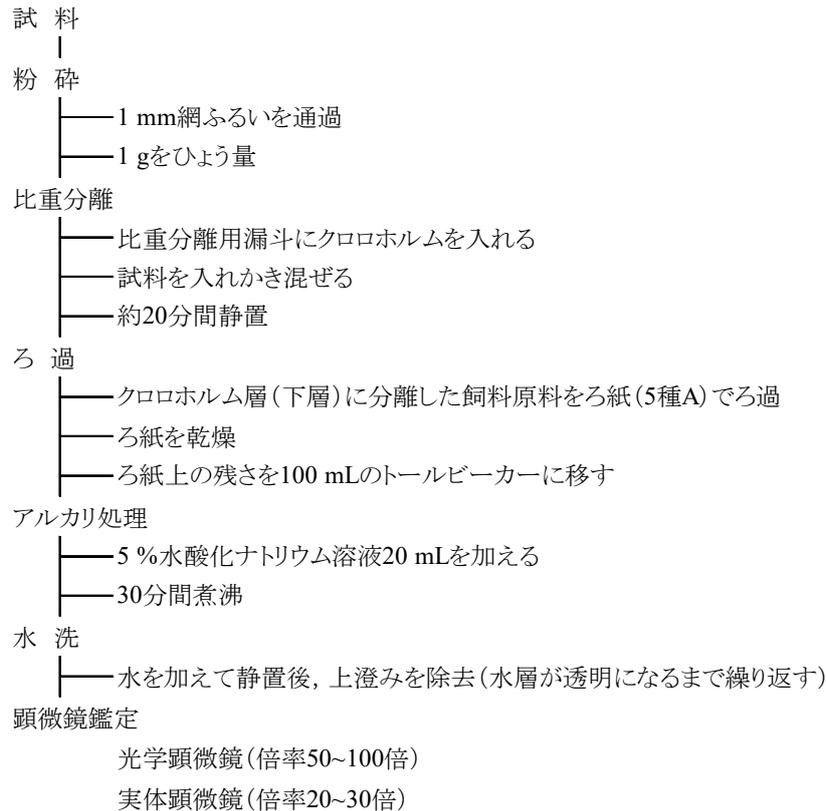


図1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

### 3 結 果

#### 3.1 有害物質

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

##### 1) かび毒

配混合飼料 112 点、単体飼料 206 点について、指導基準値等が定められているアフラトキシン B<sub>1</sub>、ゼアラレノン、デオキシニバレノール及びフモニシンの 4 成分のモニタリング及びサーベイランス、並びに指導基準値等が定められていないかび毒の 20 成分のサーベイランスを実施した。指導基準値等が定められている 4 成分の結果を表 2-1 に、指導基準値等が定められていない 20 成分の結果を表 2-2 に示した。主なかび毒についての結果は、以下のとおりであった。

##### i アフラトキシン B<sub>1</sub>

配混合飼料 89 点中 11 点から検出され（検出率 12 %）、最大値は 0.005 mg/kg、検出されたものの平均値（以下同様）は 0.001 mg/kg であり、指導基準値（乳用牛用 0.01 mg/kg）及び管理基準値（幼すう用、ブロイラー前期用、ほ乳期子豚用及びほ乳期子牛用は 0.01 mg/kg、それ以外の配混合飼料は 0.02 mg/kg. ）を超えるものはなかった。

とうもろこし 34 点中 4 点から検出され（検出率 12 %）、最大値は 0.0008 mg/kg、平均値は 0.0006 mg/kg であり、管理基準値（0.02 mg/kg）を超えるものはなかった。

## ii ゼアラレノン

配混合飼料 89 点中 87 点から検出され（検出率 98 %），最大値は 0.35 mg/kg，平均値は 0.056 mg/kg であり，管理基準値（家畜及び家きんに給与される配合飼料で 0.5 mg/kg）を超えるものはなかった。

単体飼料の指導基準値等は定められていないが，とうもろこし 34 点中 31 点から検出され（検出率 91 %），最大値は 0.28 mg/kg，平均値は 0.077 mg/kg であった。とうもろこしの加工副産物の一部では定量値の高いものがあり，DDGS の平均値は 0.45 mg/kg（最大値 1.1 mg/kg）及びコーングルテンミールの平均値は 0.86 mg/kg（最大値 3.0 mg/kg）であった。

## iii デオキシニバレノール

配混合飼料 89 点中 82 点から検出され（検出率 92 %），最大値は 0.82 mg/kg，平均値は 0.31 mg/kg であり，管理基準値（反すう動物（ほ乳期のものを除く。）に給与される配合飼料は 3 mg/kg，家畜（反すう動物（ほ乳期のものを除く。）を除く。）及び家きんに給与される飼料は 1 mg/kg）を超えるものはなかった。

単体飼料の指導基準値等は定められていないが，とうもろこし 34 点中 26 点から検出され（検出率 76 %），最大値は 0.93 mg/kg，平均値は 0.44 mg/kg であった。とうもろこしの加工副産物の一部では定量値の高いものがあり，コーングルテンフィードの平均値は 2.4 mg/kg（最大値 4.6 mg/kg），DDGS の平均値は 2.7 mg/kg（最大値 5.3 mg/kg）及びコーングルテンミールの平均値は 0.28 mg/kg（最大値 0.81 mg/kg）であった。

## iv フモニシン

配混合飼料 78 点中 77 点から検出され（検出率 99 %），最大値は 3.1 mg/kg，平均値は 0.48 mg/kg であり，管理基準値（家畜及び家きんに給与される配合飼料は 4 mg/kg）を超えるものはなかった。

単体飼料の指導基準値等は定められていないが，とうもろこし 34 点中 33 点から検出され（検出率 97 %），最大値は 2.1 mg/kg，平均値は 0.73 mg/kg であった。とうもろこしの加工副産物の一部では定量値の高いものがあり，コーングルテンミールの平均値は 1.1 mg/kg（最大値 3.1 mg/kg）であった。

表 2-1 指導基準値等が定められているかび毒のモニタリング及びサーベイランスの結果

モニタリング等の 対象試料	アフラトキシンB <sub>1</sub> (検出下限 <sup>2)</sup> 0.0003 mg/kg)						ゼアラレノン (検出下限 <sup>2)</sup> 0.0003 mg/kg)						
	指導/管理 基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			管理 基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの					
			点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)			平均値 (mg/kg)	点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
(アフラトキシンB <sub>1</sub> のみ)													
配合飼料 (乳用牛用)	指 0.01	13	3	23	0.003	0.001							
配混合飼料 (表外 <sup>1)</sup> に示す飼料)	管 0.01	12	1	8	0.0003	0.0003	0.5	85	84	99	0.35	0.056	
配混合飼料 (上記以外の配合飼料)	管 0.02	60	7	12	0.005	0.002							
その他の混合飼料	—	4	0	0			—	4	3	75	0.10	0.068	
配混合飼料小計		89	11	12	0.005	0.001		89	87	98	0.35	0.056	
とうもろこし	管 0.02	34	4	12	0.0008	0.0006	—	34	31	91	0.28	0.077	
小麦	—	1	0	0			—	1	1	100	0.025	0.025	
小麦粉	—	1	0	0			—	1	0	0			
末粉	—	4	0	0			—	4	3	75	0.001	0.001	
マイロ	—	3	0	0			—	3	3	100	1.4	0.47	
大麦外皮	—						—						
米ぬか	—						—						
米ぬか油かす	—	2	0	0			—	2	2	100	0.030	0.016	
コーングルテンフィード	—						—	15	15	100	0.35	0.16	
雑穀酒かす	—						—						
しょう油かす	—						—						
大豆皮	—						—						
DDGS	—	22	4	18	0.001	0.0007	—	22	22	100	1.1	0.45	
ふすま	—	23	0	0			—	23	18	78	0.021	0.005	
ホミニーフード	—						—						
麦ぬか	—						—						
加糖加熱大豆油かす	—						—						
コーングルテンミール	—						—	11	11	100	3.0	0.86	
コーンジャムミール	—						—						
大豆油かす	—	27	1	4	0.0003	0.0003	—	27	27	100	0.009	0.003	
なたね油かす	—						—						
やし油かす	—						—						
カカオ豆殻	—						—						
キャッサバ	—						—						
コーンコブミール	—						—						
パイナップルかす	—						—						
ビートパルプ	—						—						
綿実	—						—						
総計		206	20	10				232	220	95			

1) 該当する配混合飼料の種類は以下のとおり。

アフラトキシン B<sub>1</sub>：幼すう用，ブロイラー肥育前期用，ほ乳期子豚用及びほ乳期子牛用  
ゼアラレノン：家畜及び家きん用

2) 複数の試験法がある成分については，低い方の検出下限を記載した。

表 2-1 指導基準値等が定められているかび毒のモニタリング及びサーベイランスの結果（続き）

モニタリング等の 対象試料	デオキシニバレノール (検出下限 <sup>2)</sup> 0.003 mg/kg)						フモニシン (検出下限 0.0006 mg/kg)					
	管理 基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			管理 基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの				
			点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)			平均値 (mg/kg)	点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
(アフラトキシンB <sub>1</sub> のみ)												
配合飼料 (乳用牛用)												
配混合飼料 (表外 <sup>1)</sup> に示す飼料)	3	35	32	91	0.82	0.37	4	75	74	99	3.1	0.49
配混合飼料 (上記以外の配合飼料)	1	50	46	92	0.73	0.28						
その他の混合飼料	—	4	4	100	0.31	0.18	—	3	3	100	0.29	0.11
配混合飼料小計		89	82	92	0.82	0.31		78	77	99	3.1	0.48
とうもろこし	—	34	26	76	0.93	0.44	—	34	33	97	2.1	0.73
小麦	—	1	1	100	0.076	0.076	—					
小麦粉	—	1	0	0			—					
末粉	—	4	2	50	0.081	0.069	—					
マイロ	—	3	1	33	0.099	0.099	—					
大麦外皮	—	1	1	100	0.026	0.026	—					
米ぬか	—	2	1	50	0.003	0.003	—					
米ぬか油かす	—						—					
コーングルテンフィード	—	15	15	100	4.6	2.4	—	15	15	100	0.25	0.076
雑穀酒かす	—	1	1	100	0.23	0.23	—					
しょう油かす	—	1	1	100	0.003	0.003	—					
大豆皮	—	4	3	75	0.021	0.016	—					
DDGS	—	22	22	100	5.3	2.7	—					
ふすま	—	23	22	96	0.50	0.20	—					
ホミニーフード	—	7	7	100	2.0	0.92	—					
麦ぬか	—	12	10	83	0.13	0.061	—					
加糖加熱大豆油かす	—	1	1	100	0.011	0.011	—					
コーングルテンミール	—	11	10	91	0.81	0.28	—	11	11	100	3.1	1.1
コーンジャムミール	—	8	7	88	1.1	0.57	—					
大豆油かす	—	27	3	11	0.10	0.046	—					
なたね油かす	—	8	3	38	0.017	0.010	—					
やし油かす	—	2	1	50	0.009	0.009	—					
カカオ豆殻	—	1	1	100	0.19	0.19	—					
キャッサバ	—	1	1	100	0.009	0.009	—					
コーンコブミール	—	2	2	100	0.010	0.009	—					
パイナップルかす	—	2	0	0			—					
ビートパルプ	—	9	3	33	0.011	0.007	—					
綿実	—	1	1	100	0.008	0.008	—					
総 計		293	228	78				138	136	99		

1) 該当する配混合飼料の種類は以下のとおり。

デオキシニバレノール：反すう動物（ほ乳期のものを除く。）用

フモニシン：家畜及び家きん用

2) 複数の試験法がある成分については、低い方の検出下限を記載した。

表 2-2 指導基準値等が定められていないかび毒のサーベイランスの結果

サーベイランスの対象成分	検出下限* (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			
			点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
アフラトキシンB <sub>2</sub>	0.0003	206	0	0		
アフラトキシンG <sub>1</sub>	0.0003	206	1	0.5	0.0005	0.0005
アフラトキシンG <sub>2</sub>	0.0003	206	0	0		
ステリグマトシスチン	0.0003	185	67	36	0.004	0.0008
HT-2トキシン	0.002	214	55	26	0.060	0.016
T-2トキシン	0.002	293	69	24	0.059	0.008
ネオソラニオール	0.002	293	8	3	0.007	0.003
フザレノン-X	0.003	293	4	1	0.017	0.009
3-アセチルデオキシニバレノール	0.006	214	25	12	0.084	0.037
15-アセチルデオキシニバレノール	0.006	214	135	63	1.2	0.14
ニバレノール	0.002	243	67	28	0.71	0.048
ジアセトキシシルペノール	0.002	214	6	3	0.007	0.004
デオキシニバレノール-3-グルコシド	0.002	214	167	78	1.0	0.11
オクラトキシンA	0.0003	89	23	26	0.007	0.001
シトリニン	0.002	89	15	17	0.052	0.011
α-ゼアララノール	0.002	195	1	1	0.004	0.004
β-ゼアララノール	0.002	195	0	0		
ゼアララノン	0.002	195	23	12	0.037	0.009
α-ゼアラレノール	0.003	195	17	9	0.022	0.008
β-ゼアラレノール	0.003	195	35	18	0.054	0.010

\*複数の試験法がある成分については、低い方の検出下限を記載した。

## 2) 重金属等

配混合飼料（養殖水産動物用を除く）34点、乾牧草等8点、魚粉等（魚粉及び肉骨粉）7点及び養殖水産動物用配合飼料33点について、管理基準値が定められている重金属等4成分のモニタリング及びサーベイランスを実施した。その結果を表3に示した。結果の概要は、以下のとおりであった。

### i カドミウム

養殖水産動物用を除く配混合飼料34点中15点から検出され（検出率44%）、最大値は0.29 mg/kg、平均値は0.12 mg/kgであり、管理基準値（0.8 mg/kg）を超えるものはなかった。

乾牧草等6点中1点から検出され（検出率17%）、その値は0.05 mg/kgであり、管理基準値（1 mg/kg）を超えていなかった。

動物質性飼料では、魚粉では33点中32点から検出され（検出率97%）、最大値は2.3 mg/kg、平均値は0.94 mg/kgであった。肉骨粉1点からは検出されなかった。いずれも、管理基準値（3 mg/kg）を超えるものはなかった。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では33点全点から検出され、最大値は1.1 mg/kg、平均値は0.49 mg/kgであった。

## ii 水銀

養殖水産動物用を除く配混合飼料 34 点中 12 点から検出され（検出率 35 %），最大値は 0.06 mg/kg，平均値は 0.02 mg/kg であり，管理基準値（0.2 mg/kg）を超えるものはなかった。

乾牧草等 8 点中 1 点から検出され（検出率 13 %），その値は 0.02 mg/kg であり，管理基準値（0.4 mg/kg）を超えていなかった。

動物質性飼料では，魚粉では 33 点中 31 点から検出され（検出率 94 %），最大値は 0.51 mg/kg，平均値は 0.16 mg/kg であった。肉骨粉 1 点からは検出されなかった。いずれも管理基準値（1 mg/kg）を超えるものはなかった。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では 33 点中 32 点から検出され（検出率 97 %），最大値は 0.34 mg/kg，平均値は 0.13 mg/kg であった。

## iii 鉛

養殖水産動物用を除く配混合飼料 34 点中 4 点から検出され（検出率 12 %），最大値は 1.5 mg/kg，平均値は 0.6 mg/kg であり，管理基準値（2 mg/kg）を超えるものはなかった。

乾牧草等 6 点中 1 点から検出され（検出率 17 %），その値は 0.9 mg/kg であり，管理基準値（3 mg/kg）を超えていなかった。

動物質性飼料では，魚粉 33 点中 20 点から検出され（検出率 61 %），最大値は 1.1 mg/kg，平均値は 0.6 mg/kg であった。肉骨粉 1 点からは検出されなかった。いずれも，管理基準値（7 mg/kg）を超えるものはなかった。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では 33 点中 15 点から検出され（検出率 45 %），最大値は 1.2 mg/kg，平均値は 0.4 mg/kg であった。

## iv ひ素

養殖水産動物用を除く配混合飼料 34 点中 18 点から検出され（検出率 53 %），最大値は 0.83 mg/kg，平均値は 0.24 mg/kg であった。稲わらを除く乾牧草等 5 点中 2 点から検出され（検出率 40 %），最大値は 0.57 mg/kg，平均値は 0.33 mg/kg であった。いずれも管理基準値（2 mg/kg）を超えるものはなかった。

稲わら 1 点からは 3.0 mg/kg 検出され，管理基準値（7 mg/kg）を超えていなかった。

動物質性飼料では，魚粉では 33 点全てから検出され，最大値は 16 mg/kg，平均値は 4.4 mg/kg であった。肉骨粉 1 点からは検出されなかった。管理基準値（魚粉は 15 mg/kg，肉骨粉は 7 mg/kg）を超えたものが魚粉で 1 点（16 mg/kg）あった。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では 33 点全点から検出され，最大値は 5.3 mg/kg，平均値は 2.7 mg/kg であった。

表3 重金属等のモニタリング及びサーベイランスの結果

モニタリング等の対象成分	管理基準値 (mg/kg)	モニタリング等の対象試料	試料点数	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
カドミウム	0.8	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	34	15	44	0.29	0.12	0.03
	1	乾牧草等	6	1	17	0.05	0.05	
	3	魚粉	33	32	97	2.3	0.94	
		肉骨粉	1	0	0			
	—	養殖水産動物用配合飼料	33	33	100	1.1	0.49	
	総計		107	81	76	2.3	0.59	
水銀	0.2	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	34	12	35	0.06	0.02	0.01
	0.4	乾牧草等	8	1	13	0.02	0.02	
	1	魚粉	33	31	94	0.51	0.16	
		肉骨粉	1	0	0			
	—	養殖水産動物用配合飼料	33	32	97	0.34	0.13	
	総計		109	76	70	0.51	0.12	
鉛	2	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	34	4	12	1.5	0.6	0.2
	3	乾牧草等	6	1	17	0.9	0.9	
	7	魚粉	33	20	61	1.1	0.6	
		肉骨粉	1	0	0			
	—	養殖水産動物用配合飼料	33	15	45	1.2	0.4	
	総計		107	40	37	1.5	0.5	
ひ素	2	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	34	18	53	0.83	0.24	0.05
		乾牧草等（稲わらを除く）	5	2	40	0.57	0.33	
	7	稲わら	1	1	100	3.0	3.0	
	15	魚粉	33	33	100	16	4.4	
	7	肉骨粉	1	0	0			
	—	養殖水産動物用配合飼料	33	33	100	5.3	2.7	
	総計		107	87	81	16	2.8	

## 3) 農薬

配混合飼料 58 点，単体飼料 169 点及び乾牧草等 9 点について，省令基準値が定められている農薬 33 成分及び省令基準値が定められていない農薬 89 成分の計 122 成分についてモニタリング及びサーベイランスを実施した。省令基準値が定められている 33 成分の結果を表 4 に，省令基準値が定められていない 89 成分の結果を表 5 に示した。

省令基準値を超過したものはなかった。

全般に，とうもろこし，とうもろこしの加工副産物及びふすまを中心に有機リン系農薬の検出率が高かった。結果の概要は以下のとおりであった。

## i クロルピリホスメチル

省令基準値が定められているとうもろこし及びマイロ（計 37 点）についてモニタリングを実施した結果，これらからは検出されなかった。

また，省令基準値が定められていない飼料 198 点についてサーベイランスを実施した結果，ふすまから 20 点中 3 点検出（検出率 15%，最大値 0.08 mg/kg）された。

## ii ピリミホスメチル

省令基準値が定められているとうもろこし及びマイロ（計 37 点）についてモニタリングを実施した結果，とうもろこしは 34 点中 5 点から検出（検出率 15%，最大値 0.30 mg/kg），マイロは 3 点中 1 点から検出（検出率 33%，0.33 mg/kg）されたが，省令基準値を超えるものはなかった。

また，省令基準値が定められていない飼料 198 点についてサーベイランスを実施した結果，7 点から検出された。その内訳は，配混合飼料 55 点中 5 点（検出率 9%，最大値 0.048 mg/kg），コーングルテンフィード 11 点中 2 点（検出率 18%，最大値 0.064 mg/kg）であった。

## iii マラチオン

省令基準値が定められているとうもろこし，マイロ及び牧草（計 45 点）についてモニタリングを実施した結果，牧草からは検出されなかった。とうもろこしは 34 点中 1 点から検出（検出率 3%，0.66 mg/kg），マイロは 3 点中 1 点から検出（検出率 33%，0.55 mg/kg）されたが，省令基準値を超えるものはなかった。

また，省令基準値が定められていない飼料 190 点についてサーベイランスを実施した結果，18 点から検出された。その内訳は，配混合飼料 55 点中 7 点（検出率 13%，最大値 0.18 mg/kg），ふすま 20 点中 6 点（検出率 30%，最大値 0.15 mg/kg），コーングルテンフィード 11 点中 3 点（検出率 27%，最大値 0.062 mg/kg），コーングルテンミール 6 点中 2 点（検出率 33%，最大値 0.040 mg/kg）であった。

## iv その他の検出された農薬

## ① 穀類

ピフェントリン（とうもろこし及びマイロ）

## ② 牧草等

イソプロチオラン（稲わら），オキサジアゾン（稲わら），クロルピリホス（稲わら），ピリダベン（稲わら）及びペンディメタリン（チモシー）

## ③ その他の原料

クロルピリホス（コーンコブミール），ジェフェノコナゾール（ビートパルプ），シラフルオフェン（米ぬか），テトラコナゾール（ビートパルプ），プロパルギット（ビートパルプ）及びプロピコナゾール（麦ぬか）

## ④ 配混合飼料

デルタメトリン及びトラロメトリン並びにフェニトロチオン

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（省令基準値が定められている成分）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値(mg/kg)	試料点数	うち検出されたもの				検出下限(mg/kg)
				点数	検出率(%)	最大値(mg/kg)	平均値(mg/kg)	
γ-BHC（リンデン）	配混合飼料（鶏・うずら、豚用）	0.05	31	0	0			
	配混合飼料（牛等用）	0.4	24	0	0			
	牧草	0.4	8	0	0			0.005
	基準値のない飼料	—	173	0	0			
	計	—	236	0	0			
BHC	配混合飼料	0.005	55	0	0			
	牧草	0.02	8	0	0			0.005
	基準値のない飼料	—	173	0	0			
	計	—	236	0	0			
DDT	配混合飼料	0.1	55	0	0			
	牧草	0.1	8	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	173	0	0			
	計	—	236	0	0			
アトラジン	とうもろこし	0.2	34	0	0			
	マイロ	0.02	3	0	0			
	牧草	15	8	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	190	0	0			
	計	—	235	0	0			
アラクロール	とうもろこし	0.02	34	0	0			
	マイロ	0.05	3	0	0			
	牧草	0.05	8	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	191	0	0			
	計	—	236	0	0			
アルドリン及び ディルドリン	配混合飼料	0.02	55	0	0			
	牧草	0.02	8	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	173	0	0			
	計	—	236	0	0			
イソフェンホス	とうもろこし	0.02	34	0	0			
	基準値のない飼料	—	202	0	0			0.02
	計	—	236	0	0			
エチオン	牧草	20	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	228	0	0			0.02
	計	—	236	0	0			
エンドリン	配混合飼料	0.01	55	0	0			
	牧草	0.01	8	0	0			0.01
	基準値のない飼料	—	173	0	0			
	計	—	236	0	0			
クロルピリホス	とうもろこし	0.1	34	0	0			
	マイロ	0.75	3	0	0			
	牧草	13	8	0	0			0.01
	基準値のない飼料	—	190	2	1	0.059	0.045	
	計	—	235	2	1	0.059	0.045	
クロルピリホスメチル	とうもろこし	7	34	0	0			
	マイロ	10	3	0	0			
	基準値のない飼料	—	198	3	2	0.080	0.062	0.02
	計	—	235	3	1	0.080	0.062	
クロルフェンビンホス	とうもろこし	0.05	34	0	0			
	基準値のない飼料	—	201	0	0			0.02
	計	—	235	0	0			
クロルプロファム	とうもろこし	0.05	34	0	0			
	基準値のない飼料	—	201	0	0			0.02
	計	—	235	0	0			

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（省令基準値が定められている成分，続き）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	試料点数	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
クロルベンジレート	とうもろこし	0.02	34	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	202	0	0			
	計	—	236	0	0			
シハロトリン	とうもろこし	0.04	34	0	0			0.02
	マイロ	0.2	3	0	0			
	牧草	0.6	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	190	0	0			
計	—	235	0	0				
ジメトエート	とうもろこし	1	34	0	0			0.02
	マイロ	0.2	3	0	0			
	牧草	2	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	190	0	0			
計	—	235	0	0				
ダイアジノン	とうもろこし	0.02	34	0	0			0.02
	マイロ	0.1	3	0	0			
	牧草	10	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	190	0	0			
計	—	235	0	0				
デルタメトリン及びトラロメトリン	とうもろこし	1	34	0	0			0.03
	マイロ	1	3	0	0			0.03
	牧草	5	8	0	0			0.045
	基準値のない飼料	—	190	1	0.5	0.037	0.037	0.03
計	—	235	1	0.4	0.037	0.037		
テルブホス	とうもろこし	0.01	34	0	0			0.005
	マイロ	0.05	3	0	0			
	牧草	1	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	190	0	0			
計	—	235	0	0				
パラチオン	とうもろこし	0.3	34	0	0			0.02
	マイロ	0.08	3	0	0			
	牧草	5	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	190	0	0			
計	—	235	0	0				
ピリミホスメチル	とうもろこし	1	34	5	15	0.30	0.15	0.02
	マイロ	1	3	1	33	0.33	0.33	
	基準値のない飼料	—	198	7	4	0.064	0.044	
	計	—	235	13	6	0.33	0.11	
フィプロニル	とうもろこし	0.02	34	0	0			0.003
	マイロ	0.01	3	0	0			
	基準値のない飼料	—	199	0	0			
	計	—	236	0	0			
フェントロチオン	とうもろこし	1	34	0	0			0.02
	マイロ	1	3	0	0			
	牧草	10	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	190	1	0.5	0.030	0.030	
計	—	235	1	0.4	0.030	0.030		
フェントエート	とうもろこし	0.4	34	0	0			0.02
	マイロ	0.4	3	0	0			
	基準値のない飼料	—	198	0	0			
	計	—	235	0	0			

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（省令基準値が定められている成分，続き）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	試料点数	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
フェンバレレート	配混合飼料（鶏・うずら用）	0.5	14	0	0			0.02
	配混合飼料（豚用）	4	17	0	0			
	配混合飼料（牛等用）	8	24	0	0			
	牧草	13	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	173	0	0			
	計	—	236	0	0			
フェンプロパトリン	牧草	20	8	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	228	0	0			
	計	—	236	0	0			
ヘプタクロル	配混合飼料	0.02	55	0	0			0.02
	牧草	0.02	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	173	0	0			
	計	—	236	0	0			
ペルメトリン	とうもろこし	2	34	0	0			0.02
	マイロ	2	3	0	0			
	牧草	55	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	190	0	0			
	計	—	235	0	0			
ペンディメタリン	とうもろこし	0.2	34	0	0			0.02
	マイロ	0.1	3	0	0			
	牧草	15	8	1	13	0.22	0.22	
	基準値のない飼料	—	190	0	0			
	計	—	235	1	0.4	0.22	0.22	
ホスメット	とうもろこし	0.05	34	0	0			0.02
	マイロ	0.05	3	0	0			
	牧草	40	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	190	0	0			
	計	—	235	0	0			
ホレート	とうもろこし	0.05	34	0	0			0.02
	マイロ	0.05	3	0	0			
	牧草	1.5	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	190	0	0			
	計	—	235	0	0			
マラチオン	とうもろこし	2	34	1	3	0.66	0.66	0.02
	マイロ	2	3	1	33	0.55	0.55	
	牧草	135	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	190	18	9	0.18	0.077	
	計	—	235	20	9	0.66	0.13	
メチダチオン	とうもろこし	0.1	34	0	0			0.02
	マイロ	0.2	3	0	0			
	牧草	12	8	0	0			
	基準値のない飼料	—	190	0	0			
	計	—	235	0	0			

表5 農薬のサーベイランスの結果（省令基準値が定められていない成分）

モニタリング等の対象成分	うち検出されたもの				うち検出されなかったもの				うち検出されたもの				
	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	検出下限 (mg/kg)
EPN	236	0		0.02	236	1	0.4	0.039	0.039	236	0	0	0.02
アセトクロール	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
アミノホス	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
アマトリン	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
アリドクロール	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
アレスリン	236	0		0.02	236	1	0.4	0.041	0.041	236	0	0	0.02
イサゾホス	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
イソプロチオラン	236	1	1.0	0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
イプロベンホス	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
エタルフルラリン	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
エディフェンホス	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
エトフェンプロックス	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	1	0.4	0.032
エトフメセート	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	1	0.4	0.051
エトプロホス	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
エトリジアゾール	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
エトリムホス	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
オキサジアゾン	236	1	0.13	0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
カズサホス	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
カルフェントラゾノエチル	236	0		0.02	236	2	0.8	0.072	0.050	236	0	0	0.02
キントゼン	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
クレンキシムメチル	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
クロルタルジメチル	236	0		0.02	236	1	0.4	0.23	0.23	236	0	0	0.02
クロルデン	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
クロルフェナピル	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
ジクロホップメチル	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
ジクロラン	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
ジフェナミド	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
ジフェノコナゾール	236	4	0.079	0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
ジメテナミド	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02
ジメピペレート	236	0		0.02	236	0	0	0.02	0.02	236	0	0	0.02

## 3.2 飼料への動物由来たん白質等の混入確認

国内で製造された魚粉 32 点及びその他の魚介類由来たん白質 2 点，並びにチキンミール 18 点及びフェザーミール 9 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった．なお，PCR 試験においてチキンミール 1 点から反すう動物由来 DNA が検出されたが，ELISA 試験において同一試料から牛由来たん白質が検出されなかったことから，混入確認判定手順に基づき牛由来たん白質の混入は認められないと総合的に判定した．肉骨粉（ポークミール）2 点及び原料混合肉骨粉 20 点について，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった．これらの結果を表 7 及び表 8 に示した．

表 7 動物由来たん白質のモニタリングの結果（魚粉等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			反すう動物由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
魚粉	32	0	0	32	0	0	32	0	0	0
魚介類すり身	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
イカ内臓溶解液	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
計	34	0	0	34	0	0	34	0	0	0

表 8 動物由来たん白質のモニタリングの結果（チキンミール，肉骨粉等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			反すう動物由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
チキンミール	18	0	0	18	0	0	18	1	6	0
フェザーミール	9	0	0	9	0	0	9	0	0	0
肉骨粉（ポークミール）				2	0	0	2	0	0	0
原料混合肉骨粉				20	0	0	20	0	0	0
計	27	0	0	49	0	0	49	1	2	0

国内で製造された若令牛育成用配合飼料 5 点，乳用牛飼育用配合飼料 16 点，肉用牛肥育用配合飼料 16 点，種牛飼育用配合飼料 1 点，肉牛繁殖用配合飼料 3 点，牛複数ステージ用配合飼料 6 点，二種混合飼料（大麦、とうもろこし）1 点，糖蜜吸着飼料 1 点，その他の牛用混合飼料 10 点及びその他の畜種向けの混合飼料（動物質原料を含むもの）2 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった．これらの結果を表 9 に示した．

輸入された牛用混合飼料 19 点及び飼料用酵母等 3 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験による牛由来たん白質の混入確認を実施した結果，いずれの飼料からも混入は認められなかった．これらの結果を表 10 に示した．

表 9 動物由来たん白質のモニタリングの結果（国内製造牛用飼料等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数			
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			ほ乳動物由来DNA				反すう動物由来DNA		
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)		試験 点数	検出 点数	検出率 (%)
牛用飼料等													
若令牛育成用配合飼料	5	0	0	5	0	0	5	0	0				0
乳用牛飼育用配合飼料	16	0	0	13	0	0	13	0	0				0
肉用牛肥育用配合飼料	16	0	0	15	0	0	15	0	0				0
肉牛繁殖用配合飼料	3	0	0	3	0	0	3	0	0				0
種牛飼育用配合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
牛複数ステージ用配合飼料	6	0	0	4	0	0	4	0	0				0
大麦・とうもろこし二種混合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
糖蜜吸着飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
上記以外の混合飼料	10	0	0	10	0	0	10	0	0				0
小計	59	0	0	53	0	0	53	0	0	0	0	0	0
その他の畜種向け飼料 (動物質原料を含むもの)													
フィッシュソリュブル吸着飼料	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
その他の混合飼料	1	0	0	1	0	0				1	0	0	0
小計	2	0	0	2	0	0				2	0	0	0
合計	61	0	0	55	0	0	53	0	0	2	0	0	0

表 10 動物由来たん白質のモニタリングの結果（輸入飼料等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			反すう動物由来DNA			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
牛用混合飼料										
アメリカ合衆国	9	0	0	9	0	0	9	0	0	0
中華人民共和国	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0
イタリア	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0
タイ	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
台湾	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
フランス	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ブルガリア	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ブラジル	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
小計	19	0	0	19	0	0	19	0	0	0
酵母菌培養物										
アメリカ合衆国	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
飼料用酵母										
アメリカ合衆国	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
乾燥酵母細胞壁										
英国	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
小計	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0
合計	22	0	0	22	0	0	22	0	0	0

## 3.3 不溶性不純物

飼料用として出荷，流通している動物性油脂（確認済動物性油脂，回収食用油，混合油脂等）44 点について，不溶性不純物の含有量を測定した結果，不溶性不純物の成分規格を超えるものはなかった。その結果を表 11 に示した。

表 11 不溶性不純物のモニタリングの結果

モニタリングの 対象試料	成分規格	試料点数	最大値 (%)	平均値 (%)
動物性油脂	0.15%以下	44	0.118	0.029

## 3.4 サルモネラ

国内で製造された単体飼料 55 点及び配混合飼料 46 点についてモニタリングを実施した結果、単体飼料及び配混合飼料どちらでもサルモネラは検出されなかった。なお、単体飼料では、前年度の検出率は 1.1%，前々年度の検出率は 0%であった。配混合飼料では、前年度の検出率は 0%，前々年度の検出率は 1.2%であった。これらの結果を表 12 及び表 13 に示した。

表 12 サルモネラのモニタリングの結果（単体飼料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試験点数	検出点数	検出率 (%)
動物質性飼料			
魚粉	22	0	0
チキンミール	14	0	0
フェザーミール	2	0	0
肉骨粉（ポークミール）	2	0	0
原料混合肉骨粉	12	0	0
魚介類すり身	1	0	0
そうこう類			
米ぬか油かす	1	0	0
植物性油かす類			
大豆油かす	1	0	0
計	55	0	0

表 13 サルモネラのモニタリングの結果（配混合飼料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試験点数	検出点数	検出率 (%)
牛用配合飼料	16	0	0
鶏用配合飼料	5	0	0
豚用配合飼料	17	0	0
フィッシュソリュブル吸着飼料	1	0	0
その他の混合飼料	7	0	0
計	46	0	0

## 文 献

- 1) 法律：飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律，昭和 28 年 4 月 11 日，法律第 35 号 (1953).
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，省令第 35 号 (1976).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).

- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) 農林省畜産局長通知：飼料等検査実施要領の制定について，昭和 52 年 5 月 10 日，52 畜 B 第 793 号 (1977).
- 6) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知：飼料中の農薬の検査について，平成 18 年 5 月 26 日，18 消安第 2322 号 (2006).
- 7) 日本油化学会規格試験法委員会編：2.1.1 試料採取方法，基準油脂分析試験法 2013 年版，日本油化学会 (2013) (ISBN: 9784931249066).
- 8) 泉 和夫，石橋 隆幸，青山 幸二，石黒 瑛一：飼料研究報告，27，233 (2002).
- 9) 農林水産省生産局畜産部飼料課課長補佐（検査指導班担当）事務連絡：牛を対象とする飼料の抽出検査の取扱いについて，平成 14 年 11 月 8 日 (2002).
- 10) 農林水産省生産局長通知：反すう動物用飼料への反すう動物等由来たん白質の混入防止に関するガイドラインの制定について，平成 13 年 6 月 1 日，13 生畜第 1366 号 (2001).

**調査資料****2 特定添加物検定結果等について（令和 2 年度）**

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課

**Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2020)**

特定添加物とは、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年法律第 35 号．以下「飼料安全法」という．）第 3 条第 1 項の規定に基づき規格が定められた飼料添加物のうち、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律施行令（昭和 51 年政令第 198 号）第 2 条第 2 号に定められた抗菌性物質製剤をいう．特定添加物は、飼料安全法第 5 条第 1 項の規定により、独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という．）が行う検定を受け、検定合格証紙が付されたものでなければ販売してはならないこととされている．ただし、飼料安全法第 7 条第 1 項の登録を受けた特定飼料等製造業者（以下「登録特定飼料等製造業者」という．）が製造し、同法第 16 条第 1 項の表示が付されたもの及び同法第 21 条第 1 項の登録を受けた外国特定飼料等製造業者が製造し、同条第 2 項の表示が付されたものについては、この限りではない．

令和 2 年度に FAMIC に対して検定の申請があり、これに合格した特定添加物について、結果をとりまとめたのでその概要を報告する．また、令和 2 年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等についても併せて報告する．なお、令和 2 年度末の時点で、外国特定飼料等製造業者の登録はない．

**1 特定添加物の検定申請業者及び品名等**

令和 2 年度に検定に合格した特定添加物について、その種類及び品名等を申請業者別に表 1 に示した．

申請は 4 業者（前年度 6 業者）からあり、その製造形態等は、①製剤の製造のみを行っているのが 1 業者、②製造用原体の輸入及び製剤の製造を行っているのが 1 業者、③製剤の輸入のみを行っているのが 2 業者であり、製造用原体は全て輸入品であった．

令和 2 年度に検定に合格した特定添加物は 6 種類、8 銘柄（前年度 5 種類、8 銘柄）であった．

製造用原体又は製剤の輸入先国は、①アビラマイシン（製剤）が英国、②ナラシン（製剤）が米国、③モネンシンナトリウム（製剤）がブルガリア、④フラボフォスフォリポール（製剤）がブルガリア、⑤サリノマイシンナトリウム（製造用原体）が中国及びブルガリア、⑥サリノマイシンナトリウム（製剤）がブルガリア、⑦エンラマイシン（製造用原体）が中国で、4 カ国（前年度 4 カ国）であった．

表 1 検定申請業者及び品名等一覧  
(令和 2 年度)

管区 <sup>※1</sup>	申請業者名	製造事業場名	特定添加物の種類	飼料級に 該当	申請品名	含有力価 (mg(力価)/g)
本部	エランコジャパン株式会社 <sup>※2※3</sup>	-	アピラマイシン	○	サーマックス200	200
			ナラシン	○	モンテパン100	100
	日本ニュートリション株式会社	鹿島工場	サリノマイシンナトリウム	○	サコックス100	100
	ロック化学製品株式会社	御殿場工場	エンラマイシン	○	エンラマイシン8%R	80
神戸	エランコジャパン株式会社 <sup>※2※3</sup>	-	アピラマイシン	○	サーマックス200	200
			ナラシン	○	モンテパン100	100
	Huvepharma Japan株式会社 <sup>※2</sup>	-	サリノマイシンナトリウム	○	サコックス100	100
			サリノマイシンナトリウム	○	サコックス200	200
			モネンシンナトリウム		モノテック200	200
			フラボフォスフォリポール	○	フラボマイシン80	80
計	4業者	2事業場	6種類		8銘柄	

※1 本部管区：関東・甲信越・静岡，神戸管区：近畿・中国（山口除く）・四国

※2 輸入業者に該当

※3 倉庫の統合により7月から本部管区に変更

## 2 特定添加物の種類別の検定合格件数等

令和 2 年度の特定添加物の種類別の検定合格件数，合格数量及び実量力価換算量を平成 30 年度及び令和元年度の結果とともに表 2 に示した。

令和 2 年度の検定合格件数は 133 件，合格数量は 842 トンで実量力価換算量は 95 トン(力価)であった。件数，数量及び実量力価換算量の対前年度比は，それぞれ 109.0 %，135.2 %，127.0 % となり，件数，数量及び実量力価換算量ともに増加した。

令和 2 年度の検定合格数量を種類別にみると，サリノマイシンナトリウムが全体の 53.9 %（前年度 44.1 %）で最も多く，次いでナラシン 31.6 %（前年度 30.7 %），アピラマイシン 7.1 %（前年度 14.2 %），フラボフォスフォリポール 5.0 %（前年度 4.7 %），モネンシンナトリウム 2.1 %（前年度 6.4 %），エンラマイシン 0.3 %（前年度実績なし）となった。また，実量力価換算量については，令和 2 年度はサリノマイシンナトリウムが全体の 51.8 %（前年度 36.8 %）で最も多く，次いでナラシン 28.1 %（前年度 25.6 %），アピラマイシン 12.6 %（前年度 23.7 %），モネンシンナトリウム 3.8 %（前年度 10.7 %），フラボフォスフォリポール 3.5 %（前年度 3.1 %），エンラマイシン 0.2 %（前年度実績なし）となった。

令和 2 年度の検定合格数量及び実量力価換算量を前年度と比較すると，サリノマイシンナトリウム，ナラシン及びフラボフォスフォリポールは増加したが，アピラマイシン及びモネンシンナトリウムは減少し，前年度検定実績がなかったエンラマイシンは申請があった。

亜鉛バシトラシンは平成 28 年度から，ラサロシドナトリウムは平成 22 年度から，センデュラマイシンナトリウムは平成 19 年度から，ビコザマイシンは平成 11 年度から検定の申請がなく，これらは令和 2 年度も申請がなかった。なお，ラサロシドナトリウムは，後述の表 4 に示したとおり，登録特定飼料等製造業者による製造実績があった。

表2 検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量（種類別）  
（平成30年度～令和2年度）

類別	特定添加物の種類	平成30年度				令和元年度				令和2年度			
		合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	構成比 (%)	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	構成比 (%)	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	構成比 (%)
ポリパプチド系	亜鉛バシトリン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	エンラマイシン	2	5,380	430	0.6	—	—	—	—	2	2,780	222	0.3
	ノシヘブタイド	18	72,720	2,909	4.2	—	—	—	—	—	—	—	—
ホスホグリコリピッド系	小	20	78,100	3,339	4.9	0	0	0	0.0	2	2,780	222	0.3
	フラボフォスフォルリポール	—	—	—	—	8	29,250	2,340	3.1	5	41,900	3,352	5.0
	小計	0	0	0	0.0	8	29,250	2,340	3.1	5	41,900	3,352	5.0
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	53	218,560	21,856	31.8	64	274,626	27,463	36.8	79	454,195	49,017	51.8
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ナラシン	14	149,825	14,983	21.8	21	191,000	19,100	25.6	29	266,050	26,605	28.1
	モネンシンナトリウム	3	12,160	2,432	3.5	5	39,960	7,992	10.7	2	18,000	3,600	3.8
	ラサロシドナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
オルトソマイシン系	小	70	380,545	39,271	57.1	90	505,586	54,555	73.2	110	738,245	79,222	83.7
	アピラマイシン	36	130,975	26,195	38.1	24	88,175	17,635	23.7	16	59,425	11,885	12.6
	小計	36	130,975	26,195	38.1	24	88,175	17,635	23.7	16	59,425	11,885	12.6
その他	ピコザマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	小計	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0
総計	計	126	589,620	68,805	100.0	122	623,011	74,530	100.0	133	842,350	94,681	100.0
対前年度比 (%)	計	82.9	81.4	84.5	—	96.8	105.7	108.3	—	109.0	135.2	127.0	—

—：実績なし

### 3 特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数等

特定添加物は、培養後の製造方法の違いにより、精製級と飼料級に区分される。前者は、抗生物質の有効成分のみを培養液から抽出及び精製した高純度の製造用原体に由来するもので、後者は、抗生物質の有効成分、製造に用いた培地成分及び菌体成分を含む培養液を乾燥した製造用原体に由来するものである。

令和2年度の特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量を表3に示した。

精製級と飼料級の割合を比較すると、飼料級が検定合格件数全体の98.5%（前年度95.9%）、検定合格数量全体の97.9%（前年度93.6%）、実量力価換算量全体の96.2%（前年度89.3%）を占めた。

ノシヘプタイド及びサリノマイシンナトリウムは、精製級と飼料級の両規格が設定されているが、令和2年度は、ノシヘプタイドは精製級と飼料級のどちらも検定の実績がなく、サリノマイシンナトリウムは飼料級のみ検定の実績があった。

表3 検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量（精製級・飼料級別）  
（令和2年度）

類 別	特 定 添 加 物 の 種 類	精 製 級 <sup>※</sup>			飼 料 級 <sup>※</sup>		
		合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))
ポリペプチド系	亜鉛バシトラシン	—	—	—	—	—	—
	エンラマイシン	—	—	—	2	2,780	222
	ノシヘプタイド	—	—	—	—	—	—
ホスホグリコリピッド系	フラボフォスフォルボール	—	—	—	5	41,900	3,352
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	—	—	—	79	454,195	49,017
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—	—	—
	ナラシン	—	—	—	29	266,050	26,605
	モネンシンナトリウム	2	18,000	3,600	—	—	—
ラサロシドナトリウム	—	—	—	—	—	—	
オルトソマイシン系	アピラマイシン	—	—	—	16	59,425	11,885
その他	ピコザマイシン	—	—	—	—	—	—
合 計		2	18,000	3,600	131	824,350	91,081
割 合 (%)		1.5	2.1	3.8	98.5	97.9	96.2

—：実績なし

※ 斜線は、当該区分の規格がないことを示す。

### 4 特定添加物の類別の検定合格数量等の推移

平成23年度から令和2年度までの過去10年間における特定添加物の類別の検定合格数量及び実量力価換算量の推移をそれぞれ図1及び図2に示した。

検定合格数量は、増減はあるものの令和元年度までは減少傾向で推移していたが、令和2年度に前年比3割増と大幅に増加した。また、実量力価換算量も同様の傾向であった。

検定合格数量を類別にみると、ポリエーテル系が全体の50%以上で推移していた。令和2年度は、ポリエーテル系が87.6%（前年度81.2%）、オルトソマイシン系が7.0%（前年度14.2%）、ホスホグリコリピッド系が5.0%（前年度4.7%）、ポリペプチド系が0.4%（前年度実績なし）であった。

類別の実量力価換算量も検定合格数量と同様の傾向であった。令和2年度は、ポリエーテル系が83.7%（前年度73.2%）、オルトソマイシン系が12.6%（前年度23.7%）、ホスホグリコリピッド系が3.5%（前年度3.1%）、ポリペプチド系が0.2%（前年度実績なし）となった。

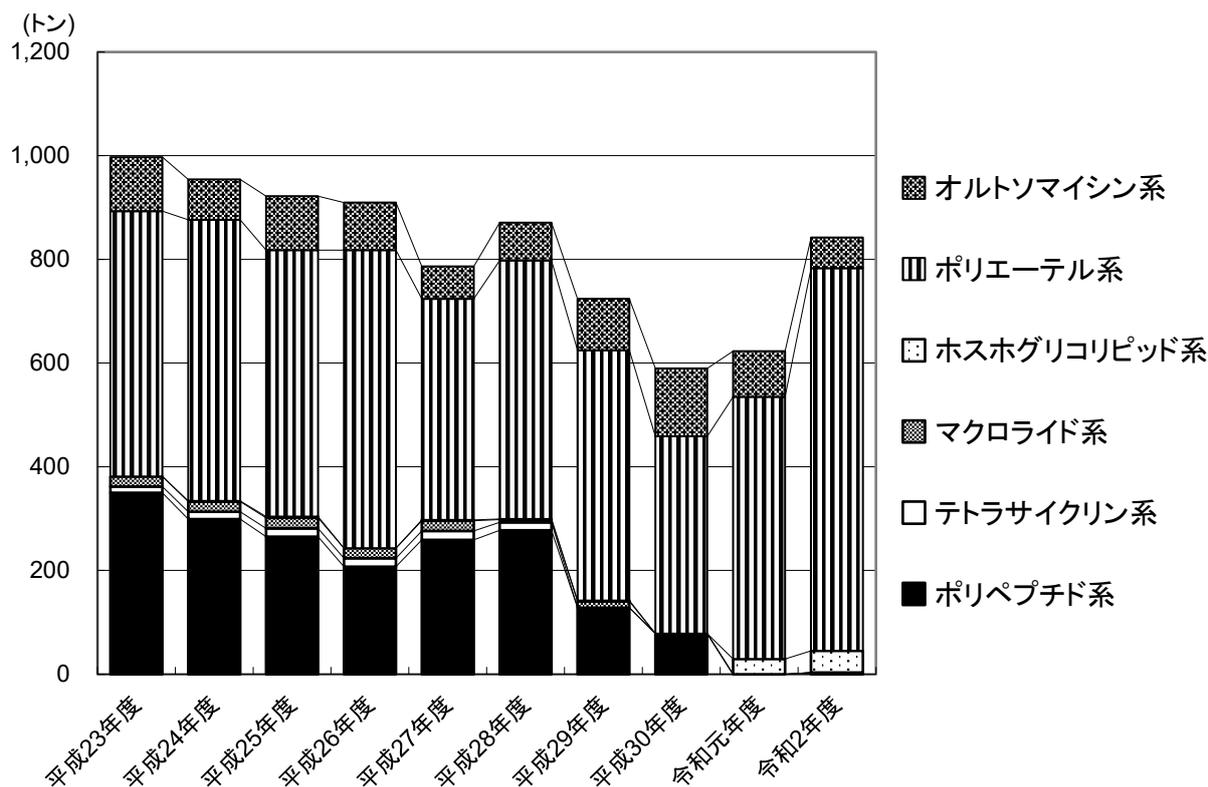


図1 特定添加物の検定合格数量の推移（類別）

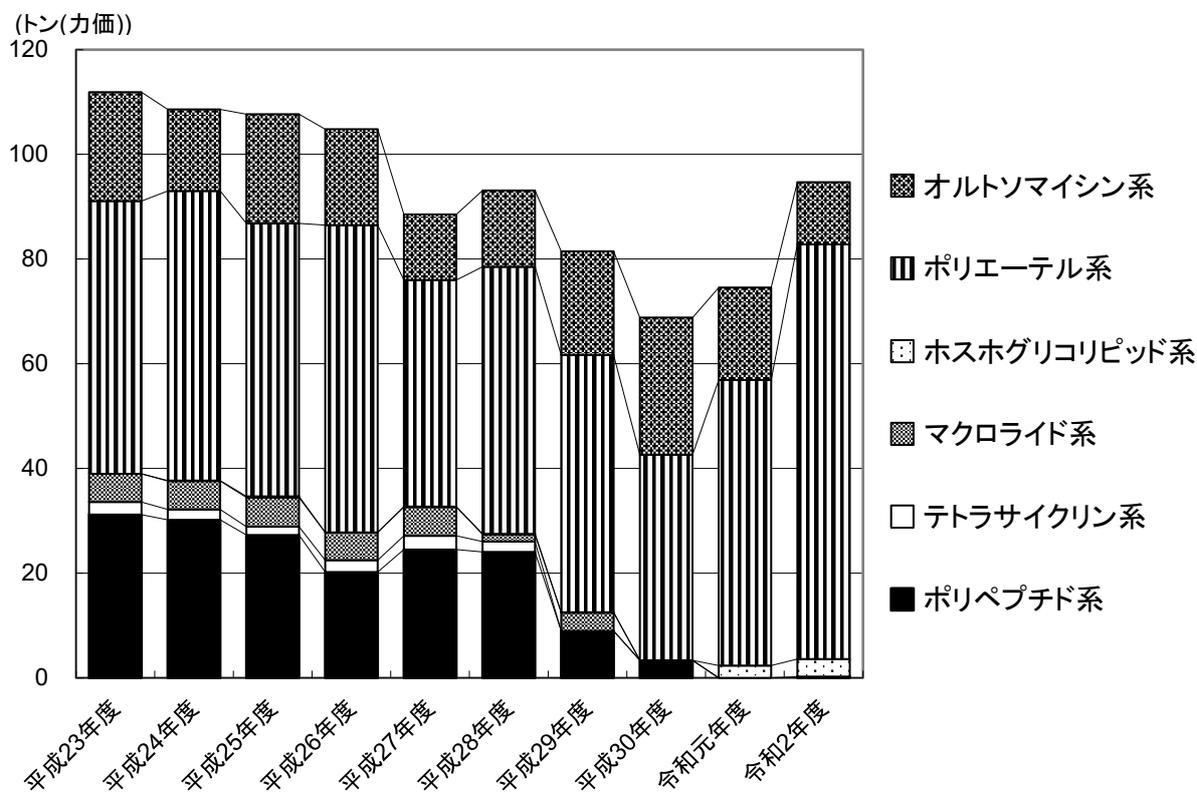


図2 特定添加物の検定合格の実量カ価換算量の推移（類別）

## 5 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等

令和2年度末の時点で、株式会社科学飼料研究所龍野工場がエンラマイシン、サリノマイシンナトリウム、ノシヘプタイド、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウム、コーキン化学株式会社九州工場第三工場がノシヘプタイドに係る登録特定飼料等製造業者の事業場として登録されている。なお、平成29年度から令和2年度においてコーキン化学株式会社九州工場第三工場による製造実績はなく、令和3年4月16日付けで登録が廃止されている。

令和2年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量及び実量力価換算量を表4に示した。なお、ラサロシドナトリウム及びノシヘプタイドは、表2で示したとおり検定実績はなかったが、登録特定飼料等製造業者による製造実績があった。

令和2年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量は813トン（対前年度比89.5%）、実量力価換算量は120トン(力価)（対前年度比95.4%）であった。

令和2年度の製造数量は、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ノシヘプタイド、エンラマイシンの順に多かった。また、実量力価換算量は、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、サリノマイシンナトリウム、エンラマイシン、ノシヘプタイドの順に多かった。

表4 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等  
(令和元・2年度)

類別	特定添加物の種類	令和元年度		令和2年度	
		製造数量※ (kg)	実量力価換算量 (kg(力価))	製造数量※ (kg)	実量力価換算量 (kg(力価))
ポリペプチド系	エンラマイシン	50,400	4,032	44,920	3,594
	ノシヘプタイド	59,540	2,382	80,940	3,238
	小計	109,940	6,414	125,860	6,831
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	320,600	32,060	146,380	14,638
	モネンシンナトリウム	315,980	63,196	351,520	70,304
	ラサロシドナトリウム	161,720	24,258	188,840	28,326
	小計	798,300	119,514	686,740	113,268
総計		908,240	125,928	812,600	120,099
対前年度比 (%)		100.2	98.6	89.5	95.4

※ 各登録特定飼料等製造業者より聞き取り

## 6 特定添加物の総数量等

令和2年度の特定添加物の検定合格数量（製造及び輸入）と登録特定飼料等製造業者による製造数量の総計（以下「総数量」という。）及びその実量力価換算量を表5に示した。

令和2年度に製造及び輸入された特定添加物は8種類あり、総数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム（36.3%）、モネンシンナトリウム（22.3%）、ナラシン（16.1%）の順に多く、類別ではポリエーテル系が最も多く、1,425トン（検定：738トン、登録：687トン）と全体の86.1%を占めた。また、実量力価換算量を種類別にみると、モネンシンナトリウム（34.4%）、サリノマイシンナトリウム（29.6%）、ラサロシドナトリウム（13.2%）の順に多く、類別でもポリエーテル系が最も多く、192トン(力価)（検定：79トン(力価)、登録：113トン

（力価）と全体の 89.6 %を占めた。

次に、平成 23 年度から令和 2 年度までの過去 10 年間における特定添加物の総数量及び実量力価換算量の類別の推移をそれぞれ図 3 及び図 4 に示した。

登録特定飼料等製造業者による製造は平成 19 年度から開始されており、その製造数量は年々増加し、平成 29 年度から令和元年度までの 3 年間は検定合格数量を上回った。令和 2 年度は、特定添加物の総数量全体の 49.1 %（前年度 59.3 %）、実量力価換算量全体の 55.9 %（前年度 62.8 %）を登録特定飼料等製造業者による製造が占めた。

表 5 特定添加物の総数量等  
（令和 2 年度）

類 別	特定添加物の種類	総数量※1		実量力価換算量※2	
		(kg)	構成比 (%)	(kg(力価))	構成比 (%)
ポリペプチド系	亜鉛バシトラシン	—	—	—	—
	エンラマイシン	47,700	2.9	3,816	1.8
	ノシヘプチド	80,940	4.9	3,238	1.5
	小 計	128,640	7.8	7,054	3.3
ホスホグリコリピッド系	フラボフォスフォルボール	41,900	2.5	3,352	1.6
	小 計	41,900	2.5	3,352	1.6
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	600,575	36.3	63,655	29.6
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—
	ナラシン	266,050	16.1	26,605	12.4
	モネンシンナトリウム	369,520	22.3	73,904	34.4
	ラサロシドナトリウム	188,840	11.4	28,326	13.2
	小 計	1,424,985	86.1	192,490	89.6
オルトソマイシン系	アピラマイシン	59,425	3.6	11,885	5.5
	小 計	59,425	3.6	11,885	5.5
その他	ビコザマイシン	—	—	—	—
	小 計	0	0.0	0	0.0
総 計		1,654,950	100.0	214,781	100.0

—：実績なし

※1 検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造数量の総計

※2 検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造の実量力価換算量の総計

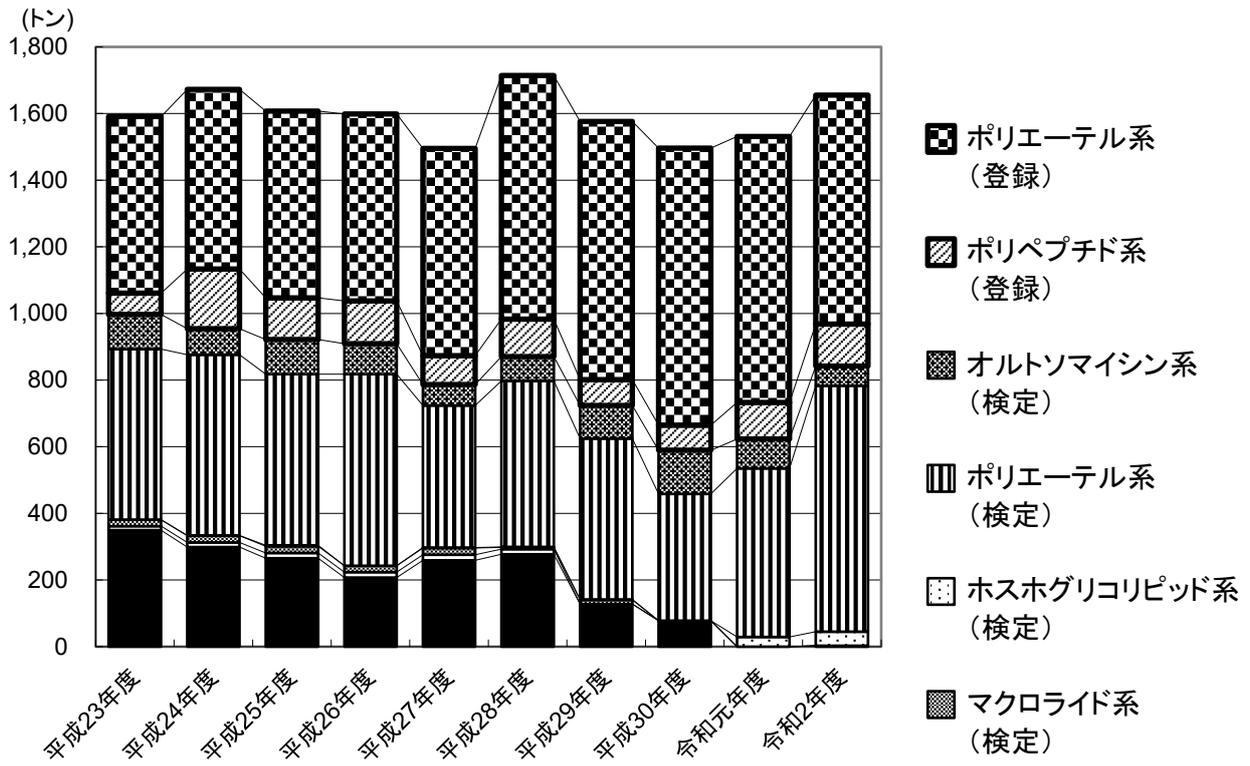


図3 特定添加物の総数量の推移 (類別)

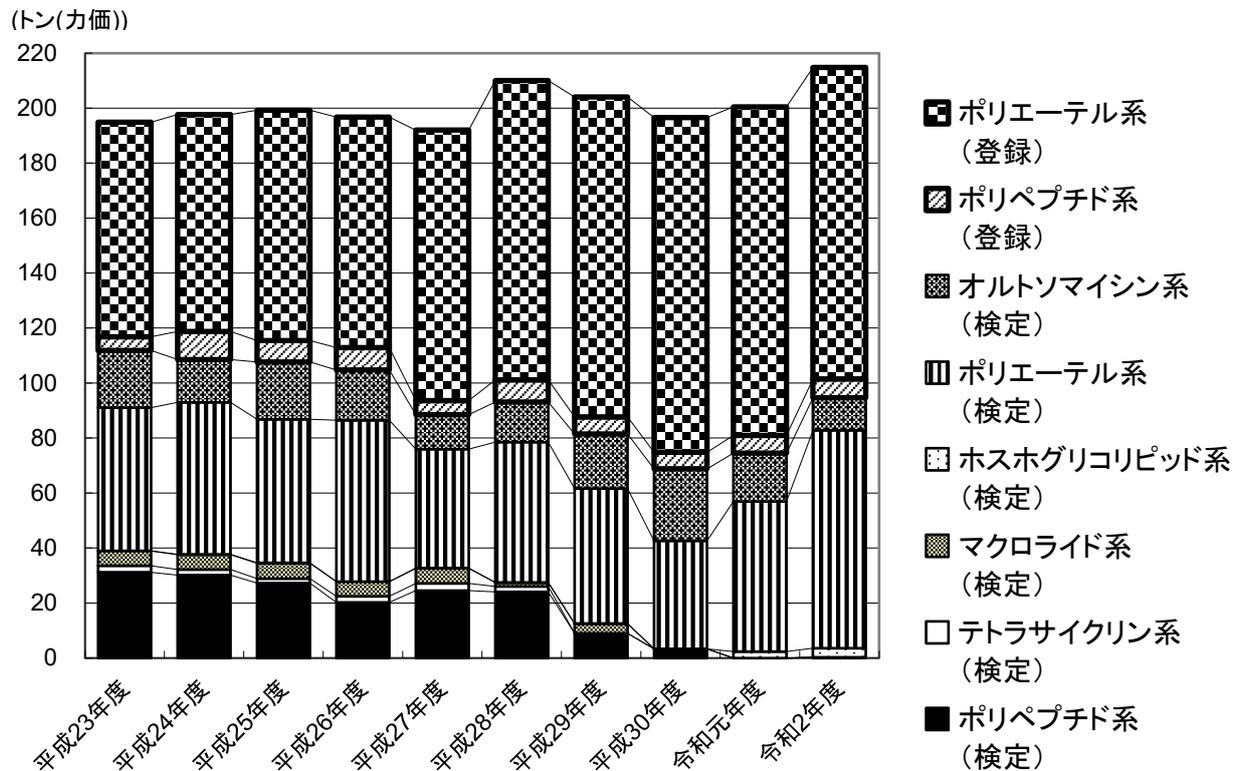


図4 特定添加物の総数の実量カ価換算量の推移 (類別)

## 7 要 約

- 1) 令和２年度の特定添加物の検定の結果は、以下のとおりである。
  - i 検定に合格した特定添加物は、４業者から申請された、６種類、８銘柄であった。
  - ii 検定合格件数は 133 件、合格数量は 842 トン、実量力価換算量は 95 トン(力価)で、前年度に比べて件数、数量及び実量力価換算量ともに増加した。
  - iii 検定合格数量の精製級と飼料級の割合を比較すると、飼料級が全体の 97.9 %を占めた。また、実量力価換算量では、飼料級が 96.2 %を占めた。
  - iv 検定合格数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、ナラシン、アピラマイシンの順に多かった。また、実量力価換算量も同様の結果であった。
  - v 検定合格数量を類別にみると、ポリエーテル系、ホスホグリコリピッド系は前年度に比べて増加したが、オルトソマイシン系は減少した。また、実量力価換算量も同様の結果であった。
- 2) 令和２年度の登録特定飼料等製造業者による製造の結果は、以下のとおりである。
  - i 登録特定飼料等製造業者に登録されているのは２業者２工場であった。
  - ii 製造実績は１業者１工場、５種類、製造数量は 813 トン、実量力価換算量は 120 トン(力価)で、前年度に比べて、製造数量及び実量力価換算量ともに減少した。
  - iii 製造数量、実量力価換算量を種類別にみると、ともにモネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、サリノマイシンナトリウムの順に多かった。
- 3) 令和２年度の特定添加物の総数量等の結果は、以下のとおりである。

特定添加物の検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造数量とを合計した総数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、ナラシンの順に多かった。また、実量力価換算量では、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウムの順に多かった。

他誌掲載論文

(抄録)

1 Development of a simultaneous quantification method for ten trichothecenes including deoxynivalenol-3-glucoside in feed

M. Nomura, K. Shidara, I. Yasuda, K. Aoyama, A. Takahashi, T. Ishibashi

Mycotoxin Research, 36 (4), 353-360 (2020).

## 飼料研究報告編集委員

委員長	功刀 豊	副委員長	荻窪 恭明
	青山 幸二		野村 昌代
	石田 有希恵		橋本 仁康
	大島 慎司		原 秀樹
	風間 鈴子		日比野 洋
	設楽 賢治		山多 利秋
	須永 善行		綿原 正志
	高橋 雄一		

## 飼料研究報告 第46号

発行 独立行政法人農林水産消費安全技術センター  
埼玉県さいたま市中央区新都心2番地1  
さいたま新都心合同庁舎検査棟  
TEL 050-3797-1857  
FAX 048-601-1179  
<http://www.famic.go.jp/>

令和3年9月

編集 飼料研究報告編集委員会

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

**リサイクル適性** 

この印刷物は、印刷用の紙へ  
リサイクルできます。