

第8章 合成抗菌物質

第1節 各条

1 アンプロリウム

1.1 定量試験法

1.1.1 液体クロマトグラフ法

(1) プレミックス

A 試薬の調製

アンプロリウム標準液 アンプロリウム [C₁₄H₁₉ClN₄·HCl] 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてアンプロリウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、アンプロリウムとして 0.5 mg 含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にアンプロリウムとして 0.5~4 µg を含有する数点のアンプロリウム標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 2~4 g を 0.001 g の桁まで量りその数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一部をメタノールで正確に希釈^{注1}し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 試料溶液を中性アルミナミニカラム (1,710 mg)^{注2}に入れ、圧^{注3}して初めの流出液 5 mL を捨て、その後の流出液 5 mL をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各アンプロリウム標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器（測定波長：265 nm）

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm）^{注4}

溶 離 液：リン酸緩衝液^{注5}—メタノール（7+3）

流 速：0.7 mL/min

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のアンプロリウム量を算出する。

注 1 アンプロリウムとして 2 µg/mL 相当量の試料溶液を調製する。

2 Sep-Pak Plus Alumina N Plus Long Cartridge（Waters 製）又はこれと同等のもの

3 流速は 2~3 mL/min とする。

4 Puresil 5µC₁₈ 120Å（Waters 製）又はこれと同等のもの

5 リン酸二水素カリウム 9.71 g (9.705~9.914 g) 及び 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム 1.35 g (1.345~1.354 g) を水に溶かして 1 L とし、リン酸で pH を 3.4~3.5 に調整する。

(参考) 分析法バリデーション

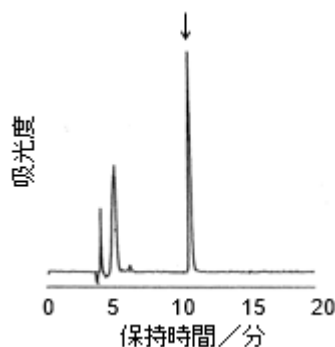
・ 添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
鶏用プレミックス1	10	3	99.1	1.7
	25	3	101	1.3
	50	3	102	0.7
鶏用プレミックス2	10	3	100	1.3
	25	3	100	1.3
	50	3	100	0.8
鶏用プレミックス3	10	3	100	0.9
	25	3	99.7	0.6
	50	3	100	2.3

・ 共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
鶏用プレミックス	7	0	25	96.3	2.4	3.7	1.1

(参考) クロマトグラム例



添加試料（鶏用プレミックス）のクロマトグラム

(2) 配合飼料

A 試薬の調製

アンプロリウム標準液 アンプロリウム [C₁₄H₁₉CIN₄·HCl] 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてアンプロリウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、アンプロリウムとして 0.5 mg 含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をメタノール-水（7+3）で正確に希釈し、1 mL 中にアンプロリウムとして 1.0~30 µg を含有する数点のアンプロリウム標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL を加えてよく混合した後水温

30~40 °C で 10 分間超音波処理し、更にメタノール 70 mL をこの液に加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,800×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 試料溶液を中性アルミナミニカラム (1,710 mg) ^{注1} に入れ、流下で流出させて初めの流出液 3 mL を捨て、その後の流出液 4 mL を 10 mL の試験管に受ける。

流出液の一部をメンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各アンプロリウム標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検出器：紫外吸光光度検出器 (測定波長：265 nm)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm) ^{注2}

溶離液：メタノール-クエン酸緩衝液^{注3} (13+7)

流速：1.0 mL/min

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のアンプロリウム量を算出する。

注 1 Sep-Pak Plus Alumina N Plus Long Cartridge (Waters 製) 又はこれと同等のもの

2 Mightysil RP-18 (関東化学製) 又はこれと同等のもの

3 クエン酸一水和物 19.2 g (19.15~19.24 g) 及び *n*-ドデシル硫酸ナトリウム 2.07 g (2.065~2.074 g) を水に溶かして 1 L とし、水酸化ナトリウム溶液 (10 mol/L) で pH を 3.5 に調整する。

(参考) 分析法バリデーション

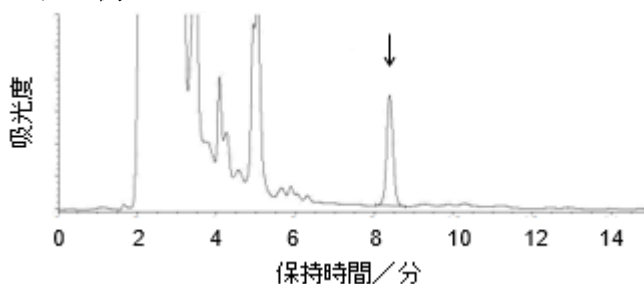
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _t (%)
幼すう育成用配合飼料	40	3	99.9	1.4
	100	3	100	1.0
	250	3	103	2.0
中すう育成用配合飼料	40	3	102	0.6
	100	3	102	0.3
	250	3	103	0.7
ブロイラー肥育前期用配合飼料	40	3	102	1.0
	100	3	100	0.6
	250	3	102	1.4

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _t (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
幼すう育成用配合飼料	9	0	100	100	0.9	2.7	0.30

(参考) クロマトグラム例



添加試料（幼う育成用配合飼料にアンプロリウムとして
100 g/t 相当量添加）のクロマトグラム

1.1.2 吸光光度法

(1) プレミックス

A 試薬の調製

- 1) 抽出溶媒 メタノール-水 (2+1)
- 2) アンプロリウム標準液 アンプロリウム $[\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{ClN}_4\cdot\text{HCl}]$ 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノール-水 (2+1) を加えて溶かし、更に標線までメタノール-水 (2+1) を加えてアンプロリウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、0.25 mg を含有する。）。
使用に際して、標準原液の一部をメタノール-水 (2+1) で正確に希釈し、1 mL 中にアンプロリウムとして 25 μg を含有するアンプロリウム標準液を調製する。
- 3) 水酸化ナトリウム液 水酸化ナトリウム溶液 (1.1 w/v%) 15 mL にメタノールを加えて 200 mL とする。
- 4) ナフタレンジオール液 2,7-ナフタレンジオール 25 mg (24.5~25.4 mg) をメタノールに溶かして 1 L とする。
- 5) 発色試薬 ナフタレンジオール液 90 mL を 250 mL の全量フラスコに入れ、フェリシアン化カリウム溶液 (0.2 w/v%) 5 mL を加えて振り混ぜ、更にシアン化カリウム溶液 (1 w/v%) 5 mL を加えて振り混ぜた後 30 分間静置する。更にこの液に水酸化ナトリウム液 100 mL を加えて振り混ぜた後、ガラスろ過器 (G2) でろ過する。

この発色試薬は、使用時に調製し、75 分以内に用いる。

B 定 量

- 抽 出 分析試料 1~3 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の分液漏斗に入れ、メタノール-水 (2+1) 100 mL を加え、1 時間振り混ぜて抽出した後静置する。抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過し、メタノール-水 (2+1) で正確に 50~500 倍に希釈し、測定に供する試料溶液とする。
- 測 定 試料溶液 4 mL を共栓遠心沈殿管に正確に入れ、発色試薬 10 mL を加えて振り混ぜた後 20 分間静置し、650 \times g で 3 分間遠心分離する。直ちに上澄み液をセルに入れ、ふたで覆い、空試験溶液 (メタノール-水 (2+1))

4 mL について試料溶液と同様に操作した液) を対照液として波長 530 nm の吸光度を測定する。

同時に、アンプロリウム標準液 4 mL を共栓遠心沈殿管に正確に入れ、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定する。

計 算 得られた吸光度から、試料中のアンプロリウム量を算出する。

(2) 配合飼料

A 試薬の調製

- 1) 抽出溶媒 (1)の A の 1)による。
- 2) アンプロリウム標準液 (1)の A の 2)による。
- 3) 塩基性アルミナ カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ (粒径 63~200 μm (230~70 メッシュ) ^{注1}を 100 °C で 3 時間乾燥する。
- 4) 水酸化ナトリウム液 (1)の A の 3)による。
- 5) ナフタレンジオール液 (1)の A の 4)による。
- 6) 発色試薬 (1)の A の 5)による。

B 定 量

抽 出 分析試料 15 g 以下 (アンプロリウムとして 1.5~2.5 mg 相当量) を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の分液漏斗に入れ、メタノール-水 (2+1) 100 mL を加え、1 時間振り混ぜて抽出した後静置する。抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 塩基性アルミナ 5 g (4.5~5.5 g) をカラム管 (内径 10 mm) に乾式で充てんし、カラムを調製する。

試料溶液 25 mL をカラムに入れ、初めの流出液 5 mL を捨て、その後の流出液を測定に供する試料溶液とする。

測 定 (1)の B の測定の項による。

計 算 (1)の B の計算の項による。

注 1 Aluminium oxide 90 active basic Art.1076 (Merck 製) 又はこれと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
成鶏飼育用配合飼料	50	6	97.3	4.1
	100	6	95.5	2.6

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
配合飼料	6	0	100	94.0	4.0	7.9	0.97

1.2 微量定量試験法

1.2.1 液体クロマトグラフ法

(適用範囲：配合飼料)

A 試薬の調製

アンプロリウム標準液 アンプロリウム [C₁₄H₁₉ClN₄·HCl] 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてアンプロリウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、アンプロリウムとして 0.5 mg 含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にアンプロリウムとして 0.1~1 µg を含有する数点のアンプロリウム標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 20 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-メタノール (4+1) 100 mL を加え、45 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×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する。

カラム処理 I 試料溶液を中性アルミナミニカラム (1,710 mg) ^{注1} に入れ、圧注^{注2}して約 30 mL を流出させる。流出液 25 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、45~50 °C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。アセトニトリル-メタノール (99+1) 10 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II 試料溶液を中性アルミナミニカラム (1,710 mg) ^{注1} に入れ、圧注^{注2}して流出させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル-メタノール (99+1) 10 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。更に、アセトニトリル-メタノール (99+1) 10 mL をミニカラムに加え、同様に流出させて洗浄する。100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-メタノール (9+1) 20 mL をミニカラムに加え、圧注^{注2}してアンプロリウムを溶出させる。溶出液を 45~50 °C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

メタノール 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 1.1.1 の(1)の B の液体クロマトグラフィーの項による。

計 算 1.1.1 の(1)の B の計算の項による。

注 1 Sep-Pak Plus Alumina N Plus Long Cartridge (Waters 製) 又はこれと同等のもの

2 流速は 2~3 mL/min とする。

(参考) 分析法バリデーション

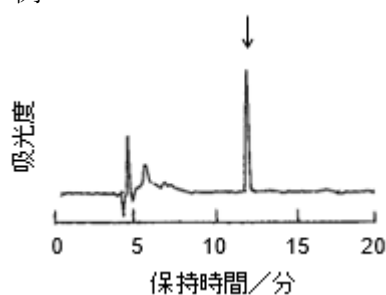
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
成鶏飼育用配合飼料	0.1	3	107	5.7
	0.5	3	101	0.5
	1	3	101	0.6
肉豚肥育用配合飼料	0.1	3	105	7.8
	0.5	3	107	3.3
	1	3	100	2.1
肉用牛肥育用配合飼料	0.1	3	99.0	3.8
	0.5	3	109	1.3
	1	3	106	3.6

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
成鶏用配合飼料	7	0	0.5	81.0	4.9	11	0.59

(参考) クロマトグラム例



添加試料（肉用配合飼料にアンプロリウムとして
0.5 g/t 相当量添加）のクロマトグラム

2 エトパベート

2.1 定量試験法

2.1.1 液体クロマトグラフ法

(1) プレミックス

A 試薬の調製

エトパベート標準液 エトパベート [C₁₂H₁₅NO₄] 20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてエトパベート標準原液を調製する（この液 1 mL は、エトパベートとして 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にエトパベートとして 0.25~2 µg を含有する数点のエトパベート標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 1~2 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一部をメタノールで正確に希釈する。この液をメ

ンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各エトパベート標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器（測定波長：270 nm）

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）^{注1}

溶 離 液：水-アセトニトリル（7+3）

流 速：1.0 mL/min

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のエトパベート量を算出する。

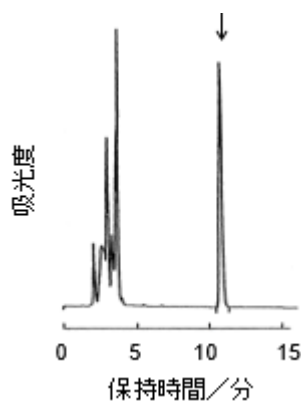
注 1 YMC-Pack ODS-A（ワイエムシィ製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
鶏用プレミックス1	0.5	3	99.0	3.6
	2.5	3	102	4.1
	7.5	3	99.3	4.8
鶏用プレミックス2	0.5	3	100	8.0
	2.5	3	101	6.5
	7.5	3	99.0	2.0
鶏用プレミックス3	0.5	3	101	1.5
	2.5	3	102	1.0
	7.5	3	99.7	1.5

（参考）クロマトグラム例



添加試料（鶏用プレミックス）のクロマトグラム

(2) 配合飼料

A 試薬の調製

- 1) エトパベート標準液 エトパベート [C₁₂H₁₅NO₄] 20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてエトパベート標準原液を調製する（この液 1 mL は、エトパベートとして 0.2 mg を含有す

る。)

使用に際して、標準原液の一部をメタノール-水 (7+3) で正確に希釈し、1 mL 中にエトパベートとして 0.25~2 µg を含有する数点のエトパベート標準液を調製する。

- 2) 中性アルミナ カラムクロマトグラフ用中性アルミナ (粒径 63~200 µm (230~70 メッシュ) ^{注1} を 120 °C で 2 時間乾燥する。

B 定 量

抽出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水 (7+3) 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×g で 5 分間遠心分離し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 中性アルミナ 5 g (4.5~5.5 g) をカラム管 (内径 10 mm) に乾式で充てんし、カラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、初めの流出液 3 mL を捨て、その後の流出液 5 mL をメンブランフィルター (孔径 0.5 µm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各エトパベート標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器 : 蛍光検出器 (励起波長 : 306 nm、蛍光波長 : 350 nm)

カ ラ ム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm) ^{注2}

溶 離 液 : 水-アセトニトリル (7+3)

流 速 : 1.0 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のエトパベート量を算出する。

注 1 Aluminium oxide 90 active neutral Art.1077 (Merck 製) 又はこれと同等のもの

2 Mightysil RP-18 GP (関東化学製) 又はこれと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

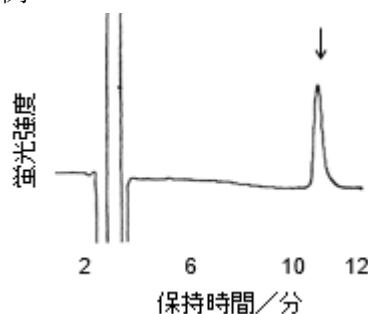
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
幼すう用配合飼料	3	3	98.6	0.9
	5	3	95.0	6.0
	15	3	95.7	2.7
中すう用配合飼料	3	3	94.4	3.7
	5	3	96.1	6.2
	15	3	97.1	5.6
ブイロー前期用配合飼料	3	3	97.2	1.6
	5	3	99.7	7.3
	15	3	100	2.9

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
中すう用配合飼料	6	0	5	88.2	1.1	1.7	0.13

(参考) クロマトグラム例



添加試料 (中すう用配合飼料にエトパベートとして 5 g/t 相当量添加) のクロマトグラム

2.2 微量定量試験法

2.2.1 液体クロマトグラフ法

(適用範囲：配合飼料)

A 試薬の調製

- 1) エトパベート標準液 エトパベート [C₁₂H₁₅NO₄] 20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてエトパベート標準原液を調製する (この液 1 mL は、エトパベートとして 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、標準原液の一部をアセトニトリルー水 (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にエトパベートとして 0.2~1 μg を含有する数点のエトパベート標準液を調製する。

- 2) 中性アルミナ カラムクロマトグラフ用中性アルミナ (粒径 63~200 μm (230~70 メッシュ) ^{注1} を 120 °C で 2 時間乾燥する。

B 定 量

抽出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノールー水 (4+1) 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×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する。

カラム処理 I 中性アルミナ 10 g (9.5~10.5 g) をカラム管 (内径 10 mm) に乾式で充てんし、カラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、初めの流出液 3 mL を捨てる。その後の流出液 10 mL ^{注2} を 50 mL のなし形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。クロロホルム 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (910 mg) ^{注3} をクロロホルム 5 mL で洗浄する。

試料溶液をミニカラムに入れ、圧注^{注4}して流出させた後、試料溶液の入っていたなし形フラスコをクロロホルム 10 mL で洗浄し、同様に操作する。更にジエチルエーテル-ヘキサン (4+1) 10 mL をミニカラムに加えて洗浄する。50 mL のなし形フラスコをミニカラムの下に置き、酢酸エチル 5 mL をミニカラムに加え、圧注^{注4}してエトパペートを溶出させる。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する。アセトニトリル-水 (1+1) 1 mL を正確に加え、残留物を溶かし、メンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各エトパペート標準液各 10 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検出器：紫外吸光光度検出器 (測定波長：270 nm)
 カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm)^{注5}
 溶離液：リン酸緩衝液^{注6}-メタノール (11+9)
 流速：0.8 mL/min
 カラム槽温度：40 °C

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さを求めて検量線を作成し、試料中のエトパペート量を算出する。

注 1 Aluminium oxide 90 active neutral Art.1077 (Merck 製) 又はこれと同等のもの

2 その後の流出液 13 mL のうちから採取する。

3 Sep-Pak Plus Florisil Cartridge (Waters 製) に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

4 流速は約 2 mL/min とする。

5 Wakosil II 5C18HG (富士フイルム和光純薬製) 又はこれと同等のもの

6 リン酸水素二ナトリウム・12 水 9.0 g (8.95~9.04 g) 及びリン酸二水素カリウム 3.4 g (3.35~3.44 g) を水に溶かして 1 L とする。

(参考) 分析法バリデーション

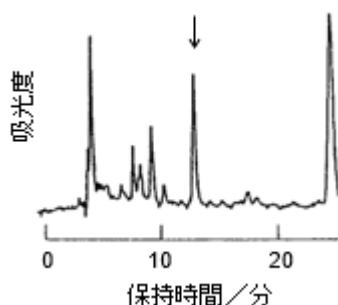
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
成鶏飼育用配合飼料	0.2	3	109	11
	0.5	3	100	11
	0.8	3	92.7	2.2
種豚育成用配合飼料	0.2	3	113	6.4
	0.5	3	95.3	2.4
	0.8	3	101	3.5
肉用牛育成用配合飼料	0.2	3	104	11
	0.5	3	92.0	1.1
	0.8	3	93.7	2.7

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
肉豚用配合飼料	6	0	0.5	95.7	4.5	5.5	0.31

(参考) クロマトグラム例



添加試料（成鶏用配合飼料にエトパベートとして 0.5 g/t 相当量添加）
のクロマトグラム

3 塩酸ロベニディン

3.1 吸光光度法

A 試薬の調製

- 1) 抽出溶媒 塩酸 8.3 mL にアセトンを加えて 1 L とする（使用時に調製する。）。
- 2) 塩酸ロベニディン標準液 塩酸ロベニディン $[C_{15}H_{13}Cl_2N_5 \cdot HCl]$ 0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、適量のメタノールを加え、50 °C の水浴中で加温しながら溶かした後放冷する。更に全量フラスコの標線までメタノールを加えて塩酸ロベニディン標準原液を調製する（この液 1 mL は、塩酸ロベニディンとして 0.4 mg を含有する。）。
使用に際して、標準原液の一部を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL 中に塩酸ロベニディンとして 2~16 μ g を含有する数点の塩酸ロベニディン標準液を調製する。
- 3) 洗浄溶媒 2-メトキシエタノール 100 mL にアセトニトリルを加えて 1 L とする。
- 4) 溶出溶媒 アンモニア水 40 mL に洗浄溶媒を加えて 1 L とする。
- 5) トリクロロ酢酸液 トリクロロ酢酸 2.0 g (1.95~2.04 g) に洗浄溶媒 4 mL を加えて振り混ぜる。
- 6) 水酸化カリウム試液 水酸化カリウム 3.0 g (2.95~3.04 g) にエタノール 100 mL を加えて振り混ぜ、上澄み液を使用する。
- 7) 塩基性アルミナ カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（粒径 53~210 μ m (270~65 メッシュ) ^{注1}を 105 °C で 3 時間乾燥する（使用時に調製する。）。

B 定 量

- 抽 出 分析試料 50 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、1 L の分液漏斗に入れ、抽出溶媒 400 mL を加え、1 時間振り混ぜて抽出した後 5 分間静置し、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過し、カラム処理に供する試料溶液とする。
- カラム処理 塩基性アルミナ 13 g (12.5~13.5 g) をカラム管（内径 13 mm）に乾

式で充てんし、カラムを調製する。

試料溶液 5 mL をカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させた後、洗浄溶媒 10 mL 及び 5 mL を順次カラムに加えて同様に流出させる。

50 mL の褐色全量フラスコをカラムの下に置き、溶出溶媒 20 mL をカラムに正確に加え、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流下し、塩酸ロベニディンを溶出させる。更に溶出溶媒 10 mL をカラムに正確に加え、同様に溶出させ、溶出液を振り混ぜて試料溶液とする。

測定 試料溶液に水酸化カリウム試液 1 mL を加えて振り混ぜる。直ちにこの液をセルに入れ、ふたで覆い、溶出溶媒を対照液として波長 440 nm 及び 550 nm の吸光度を測定し、440 nm の吸光度から 550 nm の吸光度を差し引いて吸光度 (A) を求める。

次に、トリクロロ酢酸液 3 滴をこのセルに加え、セルをふたで覆い、振り混ぜて退色させた後、同様に操作して吸光度 (B) を求め、吸光度 (A) から吸光度 (B) を差し引いて吸光度 (C) を求める。

同時に、各塩酸ロベニジン標準液各 5 mL を正確に抽出液の場合と同一条件で操作して吸光度 (D) を求める。

計算 得られた吸光度 (D) から検量線を作成し、試料中の塩酸ロベニジン量を算出する。

注 1 Alumina Woelm B Akt.1. 02069 (Woelm Pharma 製) 又はこれと同等のもの (参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
配合飼料	33	18	92.1	2.8

4 オキシリン酸

4.1 オキシリン酸及びフルメキンの液体クロマトグラフによる同時分析法 第 2 節 1 による。

5 オラキンドックス

5.1 定量試験法

5.1.1 液体クロマトグラフ法

(1) プレミックス^{注1}

A 試薬の調製

- 1) 抽出溶媒 メタノール-水 (7+3)
- 2) オラキンドックス標準液 オラキンドックス [C₁₂H₁₃N₃O₄] 50 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、抽出溶媒を加えて溶かし、更に標線まで抽出溶媒を加えてオラキンドックス標準原液を調製する (この液 1 mL は、オラキンドックスとして 0.2

mg を含有する。) 。

使用に際して、標準原液の一部を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にオラキンドックスとして 1~6 μg を含有する数点のオラキンドックス標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 1~2 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、650 \times g で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一部を抽出溶媒で正確に 100~1,000 倍に希釈し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各オラキンドックス標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器（測定波長：380 nm）

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4 mm、長さ 150mm、粒径 5 μm ）^{注2}

溶 離 液：水-メタノール（7+3）

流 速：0.7 mL/min

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のオラキンドックス量を算出する。

注 1 定量操作は遮光した状態で行う。

2 Shodex ODS pak F-411（昭和電工製（販売終了））又はこれと同等のもの

(2) 配合飼料^{注1}

A 試薬の調製

- 1) 抽出溶媒 (1)の A の 1)による。
- 2) オラキンドックス標準液 (1)の A の 2)による。
- 3) 中性アルミナ カラムクロマトグラフ用中性アルミナ（粒径 63~200 μm （230~70 メッシュ））^{注2}を 120 °C で 2 時間乾燥する。

B 定 量

抽 出 分析試料 10~20 g（オラキンドックスとして 0.5 mg 相当量）を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水（7+3）100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、650 \times g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 中性アルミナ 5 g（4.5~5.5 g）をカラム管（内径 10 mm）に乾式で充てんし、カラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、初めの流出液 3 mL を捨て、その後の流出液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフ

ィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー (1)の B の液体クロマトグラフィーの項による。

計 算 (1)の B の計算の項による。

注 1 定量操作は遮光した状態で行う。

2 Aluminium oxide 90 active neutral Art.1077 (Merck 製) 又はこれと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
ほ乳期子豚育成用配合飼料	5	6	100	3.1
	30	6	102	1.3
	70	6	101	3.1
子豚育成用配合飼料	5	6	94.6	3.7
	30	6	96.1	2.6
	70	6	94.3	2.1

・ 共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
子豚用配合飼料	5	0	25	98.9	1.6	2.5	0.26

(参考) クロマトグラム例



添加試料 (豚用配合飼料) のクロマトグラム

5.2 微量定量試験法

5.2.1 液体クロマトグラフ法^{注1}

A 試薬の調製

- 1) 抽出溶媒 5.1.1 の(1)の A の 1)による。
- 2) オラキンドックス標準液 5.1.1 の(1)の A の 2)によりオラキンドックス標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一部を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にオラキンドックスとして 0.05~0.4 μg を含有する数点のオラキンドックス標準液を調製する。
- 3) 中性アルミナ 5.1.1 の(2)の A の 3)による。

B 定 量

抽出 分析試料 10~20 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 中性アルミナ 5 g^{注2} (4.5~5.5 g) をカラム管 (内径 10 mm) に乾式で充てんし、カラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、初めの流出液 3 mL を捨て、その後の流出液 2 mL をメンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各オラキンドックス標準液各 20 μL を液クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器 (測定波長：380 nm)

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)^{注3}

溶 離 液：水-メタノール (7+3)

流 速：0.7 mL/min

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のオラキンドックス量を算出する。

注 1 定量操作は遮光した状態で行う。

2 プレミックスの場合は 10 g (9.5~10.5 g) とする。

3 Shodex ODS pak F-411 (昭和電工製 (販売終了)) 又はこれと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

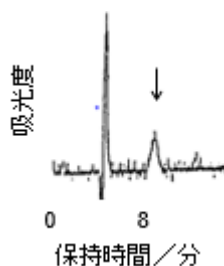
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
成鶏用プレミックス	0.5	3	91.3	8.3
	1	3	91.7	14
	2	3	87.7	1.7
肉豚用プレミックス	0.5	3	100	8.0
	1	3	101	12
	2	3	95.3	3.2
牛用プレミックス	0.5	3	110	7.6
	1	3	119	7.6
	2	3	101	9.9
成鶏飼育用配合飼料	0.5	9	105	3.7
肉豚肥育用配合飼料	0.5	9	100	7.7
乳用牛飼育用配合飼料	0.5	9	97.7	5.5

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
牛用プレミックス	6	0	0.5	101	5.9	5.9	0.33
肉用牛用配合飼料	6	0	0.5	104	4.3	7.2	0.41

(参考) クロマトグラム例



標準液（オラキンドックスとして 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）のクロマトグラム

6 カルバドックス

6.1 吸光光度法

A 試薬の調製

- 1) 抽出溶媒 クロロホルム-メタノール (3+1)
- 2) カルバドックス標準液 カルバドックス $[\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_4]$ 80 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、抽出溶媒を加えて溶かし、更に標線まで抽出溶媒を加えてカルバドックス標準原液を調製する（この液 1 mL は、カルバドックスとして 0.8 mg を含有する。）。
使用に際して、標準原液の一部を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にカルバドックスとして 80 μg を含有するカルバドックス標準液を調製する。
- 3) 塩化ナトリウム試液 塩化ナトリウム 100 g (99.5~100.4 g) を水酸化ナトリウム溶液 (0.1 mol/L) に溶かして 1 L とする。
- 4) 塩基性アルミナ カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（粒径 53~210 μm (275~65 メッシュ) ^{注1} を 200 $^{\circ}\text{C}$ で 18 時間加熱する。
- 5) ケイソウ土 ケイソウ土 ^{注2} 500 g (499.5~500.4 g) を 5 L のビーカーに入れ、塩酸 (1+1) 3 L を加えてかき混ぜた後 10 時間静置する。このケイソウ土をガラスろ過器 (G2) でろ過し、温水で洗浄し、更にメタノールで洗浄した後 10 時間風乾し、130 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間乾燥する。

B 定 量

抽 出 分析試料 20 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 140 mL を加え、栓をして 55~60 $^{\circ}\text{C}$ の水浴中で 1 時間加温して抽出した後放冷する。

抽出液を 250 mL の全量フラスコにあらかじめケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたガラスろ過器 (G1) で吸引ろ過する。先の三角フラスコ及びガラスろ過器を順次抽出溶媒 25 mL ずつで 3 回洗浄し、同様に吸引ろ過する。更に全量フラスコの標線まで抽出溶媒を加えて試料抽出液とする。

試料抽出液 100 mL をあらかじめ塩化ナトリウム試液 50 mL を入れた 300 mL の分液漏斗に加えて激しく振り混ぜた後静置し、クロロホルム層（下層）を捨てる。残留液にクロロホルム 50 mL を加え、同様に操作する。

残留液にリン酸二水素カリウム溶液 (14 w/v%) 10 mL を加えて軽く振り混ぜ、更にクロロホルム 50 mL を加え、激しく振り混ぜた後静置し、クロロホルム層

を 200 mL のなす形フラスコに入れる。更にクロロホルム 50 mL ずつで同様に 2 回操作し、各クロロホルム層を先のなす形フラスコに合わせる。クロロホルム層を 60 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、*N,N*-ジメチルホルムアミド 10 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 塩基性アルミナ 8 g (7.5~8.5 g) をカラム管 (内径 10 mm) に乾式で充てんし、上端にガラスウールを軽く詰めた後、*N,N*-ジメチルホルムアミド 10 mL を入れ、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させてカラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを *N,N*-ジメチルホルムアミド 10 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液をカラムに加え、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させる。更にジエチルエーテル 20 mL をカラムに加え、同様に流出させる。

100 mL の分液漏斗をカラムの下に置き、抽出溶媒 25 mL をカラムに加えてカルバドックスを溶出させ、測定に供する試料溶液とする。

測定 試料溶液に水酸化ナトリウム溶液 (0.1 mol/L) 10 mL を加えて振り混ぜた後静置し、クロロホルム層 (下層) を捨て、残留液を 50 mL の褐色全量フラスコに入れる。分液漏斗を水酸化ナトリウム溶液 (0.1 mol/L) で洗浄し、洗液を先の褐色全量フラスコに合わせ、更に標線まで水酸化ナトリウム溶液 (0.1 mol/L) を加える。この液の適量を褐色遠心沈殿管に入れ、150×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液について、水を対照液として波長 420 nm の吸光度を測定する。

同時に、分析試料 20 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、カルバドックス標準液 5 mL を正確に加え、更に抽出溶媒を加えて 140 mL とする。

以下カルバドックス標準液を加えない試料の場合と同様に操作して吸光度を測定する。

計算 得られた吸光度から、試料中のカルバドックス量を算出する。

注 1 Alumina Woelm B, Akt. 1. 02609 (Woelm Pharma 製) 又はこれと同等のもの
2 Celite 545 (Celite Corporation 製) 又はこれと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	表示量 (g/t)	繰返し	回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
配合飼料	0.5	8	79.6	4.9

- ・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	表示量 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
配合飼料	6	0	50	93.1	4.2	5.3	0.59

7 クエン酸モランテル

7.1 定量試験法

7.1.1 液体クロマトグラフ法

(1) プレミックス^{注1}

A 試薬の調製

クエン酸モランテル標準液　クエン酸モランテル [C₁₈H₂₆N₂O₈S] 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてクエン酸モランテル標準原液を調製する（この液 1 mL は、クエン酸モランテルとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にクエン酸モランテルとして 0.5~7 µg を含有する数点のクエン酸モランテル標準液を調製する。

B 定 量

抽 出　分析試料 3~5 g（クエン酸モランテルとして 6~60 mg 相当量）を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一部をメタノールで正確に希釈する。この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）^{注2}でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　試料溶液及び各クエン酸モランテル標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器（測定波長：320 nm）

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm）^{注3}

溶 離 液：リン酸緩衝液^{注4}—アセトニトリル（4+1）

流 速：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計 算　得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のクエン酸モランテル量を算出する。

注 1 定量操作は暗室で行い、ガラス容器等はアルミ箔等で被覆する。

2 PTFE 製等クエン酸モランテルの吸着性のないもの

3 Shodex C₁₈-5B（昭和電工製（販売終了））又はこれと同等のもの

4 リン酸二水素カリウム 6.8 g（6.75~6.84 g）を水に溶かして 1 L とし、リン酸（1+10）で pH を 3.3 に調整する。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
豚用プレミックス1	3	3	99.9	1.1
	10	3	102	0.9
	30	3	102	2.4
豚用プレミックス2	3	3	102	1.4
	10	3	103	1.0
	30	3	103	2.5
豚用プレミックス3	3	3	101	0.3
	10	3	98.6	0.4
	30	3	101	1.1

(2) 配合飼料 (その1) 注1

A 試薬の調製

- 1) クエン酸モランテル標準液 7.1.1の(1)のAの1)により、クエン酸モランテル標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一部をメタノール-水(17+3)で正確に希釈し、1 mL中にクエン酸モランテルとして0.1~5 µgを含有する数点のクエン酸モランテル標準液を調製する。

- 2) 塩基性アルミナ カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ(粒径63~200 µm(230~70メッシュ))注2を130 °Cで2時間乾燥する。

B 定 量

抽 出

- 1) 加熱試料注3 分析試料10 gを0.01 gの桁まで量り、その数値を記録し、200 mLの褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水(17+3)100 mLを加えてこの容器を密栓した後、40 °Cで、30分間かき混ぜて抽出する注4。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×gで5分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。
- 2) その他の試料 分析試料10 gを0.01 gの桁まで量り、その数値を記録し、200 mLの褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水(17+3)100 mLを加え、30分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×gで5分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 塩基性アルミナ5 g(4.5~5.5 g)をカラム管(内径10 mm)に乾式充てんし、カラムを調製する。試料溶液をカラムに入れ、初めの流出液5 mLを捨て、その後の流出液5 mLのうち一部を、5,000×gで5分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各クエン酸モランテル標準液各20 µLを液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器(測定波長：320 nm)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm）^{注5}

溶離液：リン酸緩衝液^{注6}－アセトニトリル（4+1）

流速：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

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

注1 定量操作は暗室で行い、ガラス容器等はアルミ箔等で被覆する。

2 Aluminium oxide 90 active basic Art.1076（Merck 製）又はこれと同等のもの

3 加熱試料とは、配合飼料の製造時に蒸気と圧力を加えて加工を行ったものをいう。

4 加熱は、インキュベーター等の気体による加熱よりも、ウォーターバス等の液体による加熱の方が真度及び精度ともに良好な結果が得られるため、ウォーターバス等により加熱することが望ましい。

5 Shodex C18M 4E（レゾナック製）又はこれと同等のもの

6 リン酸二水素カリウム 6.8 g（6.75~6.84 g）を水に溶かして 1 L とし、リン酸（1+10）で pH を 3.3 に調整する。

（参考）分析法バリデーション

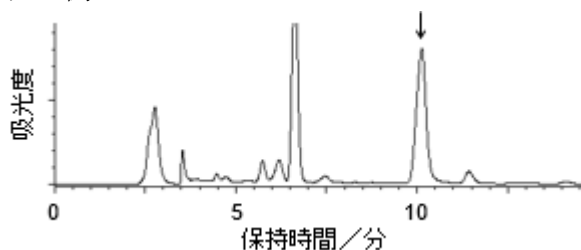
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
子豚育成用配合飼料1	15	3	98.6	3.6
	30	3	102	3.2
	45	3	90.3	2.9
子豚育成用配合飼料2	15	3	95.7	2.4
	30	3	95.7	0.5
	45	3	103	3.0
子豚育成用配合飼料3	15	3	96.6	4.6
	30	3	99.6	3.7
	45	3	101	0.3
ほ乳期子豚育成用配合飼料1(加熱試料)	30(表示量)	3	101(表示に対する割合)	1.6
ほ乳期子豚育成用配合飼料2(加熱試料)	30(表示量)	3	103(表示に対する割合)	1.8
ほ乳期子豚育成用配合飼料3(加熱試料)	30(表示量)	3	98.8(表示に対する割合)	0.6
ほ乳期子豚育成用配合飼料4(加熱試料)	30(表示量)	3	98.3(表示に対する割合)	1.4
ほ乳期子豚育成用配合飼料5(加熱試料)	30(表示量)	3	95.7(表示に対する割合)	0.3
ほ乳期子豚育成用配合飼料6(加熱試料)	30(表示量)	3	101(表示に対する割合)	2.4

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
子豚育成用配合飼料1 (非加熱飼料)	9	0	30	102	3.5	3.5	0.37
子豚育成用配合飼料2 (非加熱飼料)	9	0	30	102	2.8	3.5	0.37
ほ乳期子豚育成用配合飼料 (加熱飼料)	8	1	30 (表示量)	96.4 (表示に対する割合)	1.0	2.3	0.24

(参考) クロマトグラム例



試料（ほ乳期子豚育成用配合飼料（加熱飼料）、表示量 30 g/t）
のクロマトグラム

(3) 配合飼料（その2）^{注1}

A 試薬の調製

- 1) 抽出溶媒 水-メタノール-酢酸（15+4+1）
- 2) クエン酸モランテル標準液 クエン酸モランテル [C₁₈H₂₆N₂O₈S] 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてクエン酸モランテル標準原液を調製する（この液 1 mL は、クエン酸モランテルとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水-メタノール（7+3）で正確に希釈し、1 mL 中にクエン酸モランテルとして 0.2~5.0 µg を含有する数点のクエン酸モランテル標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,800×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）^{注2} をメタノール 4 mL 及び水 4 mL で順次洗浄する。

試料溶液 5 mL をミニカラムに入れ、圧注して液面が充てん剤の上端に達するまで流速 1 mL/min 程度で流出させる。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、水-メタノール（7+3）10 mL をミニカラムに加え、圧注して流速 1 mL/min 程度でクエン酸モランテルを溶出させる。更に全量フラスコの標線まで水-メタノール（7+3）を加え、この液の適量をプラスチック製遠心沈殿管（容量 1.5 mL）に入れ、5,000×g で 3 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各クエン酸モランテル標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器（測定波長：320 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 6.0 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）^{注3}

溶離液：リン酸緩衝液^{注4}－アセトニトリル（4+1）

流速：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

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

注 1 定量操作は暗室で行い、ガラス容器等はアルミ箔等で被覆する。

2 Sep-Pak Plus C₁₈ Cartridge（Waters 製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

3 YMC-Pack ODS-AM（ワイエムシィ製）又はこれと同等のもの

4 リン酸二水素カリウム 6.8 g（6.75~6.84 g）を水に溶かして 1 L とし、リン酸（1+10）で pH を 3.3 に調整する。

（参考）分析法バリデーション

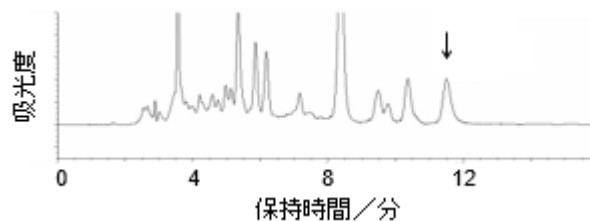
・ 添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
ほ乳期子豚育成用配合飼料	15	3	101	4.8
	30	3	95.3	1.2
	45	3	94.3	1.9
子牛育成用配合飼料1	15	3	91.6	0.8
	30	3	91.6	2.3
	45	3	96.4	0.9
子牛育成用配合飼料2	15	3	103	4.2
	30	3	104	1.9
	45	3	92.9	1.3

・ 共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	表示量 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ほ乳期子豚育成用配合飼料 (クランプル)	9	0	30	87.5	1.5	4.5	0.46
ほ乳期子豚育成用配合飼料 (マッシュ)	9	0	30	99.2	3.5	4.6	0.48

（参考）クロマトグラム例



添加試料（ほ乳期子豚育成用配合飼料にクエン酸モランテルとして 30 g/t 相当量添加）のクロマトグラム

7.2 微量定量試験法

7.2.1 液体クロマトグラフ法^{注1}

A 試薬の調製

- 1) クエン酸モランテル標準液　クエン酸モランテル [C₁₈H₂₆N₂O₈S] 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてクエン酸モランテル標準原液を調製する（この液 1 mL は、クエン酸モランテルとして 0.1 mg を含有する。）。
使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にクエン酸モランテルとして 0.05~1 µg を含有する数点のクエン酸モランテル標準液を調製する。
- 2) 塩基性アルミナ　カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（粒径 63~200 µm（230~70 メッシュ））^{注2}を 130 °C で 2 時間乾燥する。
- 3) 炭酸緩衝液　炭酸水素ナトリウム 7.6 g（7.55~7.64 g）及び炭酸ナトリウム 0.5 g（0.45~0.54 g）を水に溶かして 1 L とし、水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）で pH を 9.0 に調整する。

B 定 量

抽 出　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×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する。

カラム処理 I　塩基性アルミナ 5 g（4.5~5.5 g）をカラム管（内径 10 mm）に乾式充てんし、カラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、初めの 5 mL を捨てる。その後の流出液 10 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C の水浴で減圧乾固する。

メタノール-炭酸緩衝液（1+1）5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II　オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）^{注3}をメタノール 10 mL、水 10 mL 及び炭酸緩衝液 10 mL で順次洗浄する。

試料溶液をミニカラムに入れ、圧注^{注4}して流出させた後、試料溶液の入っていたなす形フラスコをメタノール-炭酸緩衝液（1+1）5 mL で洗浄し、同様に操作する。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、メタノール-酢酸（200+1）10 mL をミニカラムに加え、圧注^{注4}してクエン酸モランテルを溶出させる。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する。

メタノール 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、この液をメンブランフィルター^{注5}（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　7.1.1 の(1)の B の液体クロマトグラフィーの項による。

計 算 7.1.1 の(1)の B の計算の項による。

注 1 定量操作は暗室で行い、ガラス容器等はアルミ箔等で被覆する。

2 Aluminium oxide 90 active basic Art.1076 (Merck 製) 又はこれと同等のもの

3 Sep-Pak Plus C₁₈ Cartridge (Waters 製) に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

4 流速は約 2 mL/min とする。

5 PTFE 製等クエン酸モランテルの吸着性のないもの

(参考) 分析法バリデーション

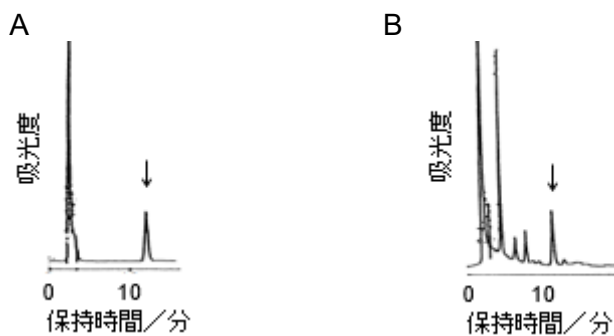
・ 添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
成鶏飼育用配合飼料	0.1	3	103	3.0
	0.5	3	99.0	3.0
	1	3	100	2.5
肉豚肥育用配合飼料	0.1	3	105	4.2
	0.5	3	98.7	2.1
	1	3	99.0	1.7
肉用牛肥育用配合飼料	0.1	3	105	3.9
	0.5	3	100	3.2
	1	3	99.7	2.3

・ 共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
肉用牛肥育用配合飼料	6	0	0.5	98.9	1.8	5.2	0.29

(参考) クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A : 標準液 (クエン酸モランテルとして 5 ng 注入)

B : 添加試料 (成鶏育成用配合飼料にクエン酸モランテルとして 0.5 g/t 相当量添加)

8 クリスタルバイオレット

- 8.1 クリスタルバイオレット及びメチレンブルー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
第2節2による。

9 クロピドール

9.1 液体クロマトグラフ法

A 試薬の調製

- 1) 抽出溶媒 メタノール-アンモニア水 (24+1)
- 2) クロピドール標準液 クロピドール [C₇H₇Cl₂NO] 0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、抽出溶媒を加えて溶かし、更に標線まで抽出溶媒を加えてクロピドール標準原液を調製する（この液 1 mL は、クロピドールとして 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にクロピドールとして 10~25 µg を含有する数点のクロピドール標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 10~20 g (クロピドールとして 1.6~2.5 mg 相当量) を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、10 分間かき混ぜて抽出する。抽出液の上澄みを共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各クロピドール標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器（測定波長：260 nm）

カ ラ ム：アミノプロピルシリル化シリカゲルカラム（内径 4 mm、長さ 150 mm、粒径 10 µm）^{注1}

溶 離 液：アセトニトリル-水 (49+1)

流 量：2 mL/min

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のクロピドール量を算出する。

注 1 LiChrosorb NH₂ (Merck 製 (販売終了)) 又はこれと同等のもの
(参考) 分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
幼すう用配合飼料	100	10	101	2.3
	200	10	98.8	1.6
ブロイラー前期用配合飼料	100	10	98.0	3.0
	200	10	96.6	6.0

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー前期用配合飼料	4	0	150	78.7	3.6	5.8	0.75

(参考) クロマトグラム例



添加試料（ブロイラー前期用配合飼料）のクロマトグラム

10 ジニトルミド

10.1 吸光光度法

A 試薬の調製

- 1) ジニトルミド標準液 ジニトルミド [C₈H₇N₃O₅] 40 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルー水 (17+3) を加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルー水 (17+3) を加えてジニトルミド標準原液を調製する（この液 1 mL は、ジニトルミドとして 0.4 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をアセトニトリルー水 (17+3) で正確に希釈し、1 mL 中にジニトルミドとして 20 µg を含有するジニトルミド標準液を調製する。

- 2) 中性アルミナ カラムクロマトグラフ用中性アルミナ（粒径 74~177 µm (200~80 メッシュ) ^{注1}

B 定 量

抽 出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリルー水 (17+3) 65 mL を加え、50 °C の水浴中でときどき振り混ぜながら 5 分間加温して抽出した後放冷する。

抽出液に中性アルミナ 12~13 g を加えて 5 分間振り混ぜ、この液を 100 mL の全量フラスコにガラスろ過器 (G3) でろ過する。先の三角フラスコ及びガラスろ過器を順次適量のアセトニトリルー水 (17+3) で洗浄し、洗液を先のガラスろ過器を通してろ液を合わせる。更に全量フラスコの標線までアセトニトリルー水 (17+3) を加えて発色に供する試料溶液とする。

発 色 試料溶液 4 mL ずつを 50 mL のビーカー 3 個 (A、B 及び C) に正確に入れ、更にビーカー C にジニトルミド標準液 2 mL を正確に加えた後、各液を 50 °C の水浴中で乾固する。

N,N-ジメチルホルムアミド-水 (19+1) 10 mL をビーカー A に正確に加えて残

留物を溶かす。同時に、*N,N*-ジメチルホルムアミド-水 (19+1) 2 mL をビーカーB 及び C に正確に加えてそれぞれの残留物を溶かした後、エチレンジアミン 8 mL をビーカーB 及び C に正確に加えて発色させ、測定に供する試料溶液とする。

測定 試料溶液をセルに入れ、ふたで覆い、*N,N*-ジメチルホルムアミド-水 (19+1) を対照液として波長 560 nm の吸光度をそれぞれ測定する。

計算 得られた吸光度から、試料中のジニトルミド量を算出する。

注 1 活性アルミナ (富士フイルム和光純薬製) 又はこれと同等のもの
(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)
成鶏用配合飼料	22	1	91.6
	44	1	92.9
	66	1	91.5
	110	1	84.2
	176	1	90.7
	220	1	90.7
ブロイラー後期用配合飼料	22	1	96.4
	44	1	94.3
	66	1	94.6
	88	1	94.7
	110	1	94.2
	132	1	93.2
	176	1	93.9
	198	1	94.3
	220	1	95.1

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
配合飼料	5	0	125	69.4	3.8	3.8	0.47

11 スルファキノキサリン

11.1 定量試験法

11.1.1 液体クロマトグラフ法

(1) プレミックス

A 試薬の調製

スルファキノキサリン標準液 スルファキノキサリン [C₁₄H₁₂N₄O₂S] 20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えてスルファキノキサリン標準原液を調製する (この液 1 mL は、スルファキノキサリンとして 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、標準原液の一部をアセトニトリル-水 (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中にスルファキノキサリンとして 2.5~15 µg を含有する数点のスルファキノキサリン標準液を調製する。

B 定量

抽出 分析試料 2.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200

mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (4+1) 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一部をアセトニトリル-水 (4+1) で正確に希釈する。この液をメンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各スルファキノキサリン標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器 (測定波長：240 nm)

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm) 注1

溶 離 液：リン酸緩衝液注2-アセトニトリル (7+3)

流 速：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のスルファキノキサリン量を算出する。

注 1 Shodex C₁₈-5B (昭和電工製 (販売終了)) 又はこれと同等のもの

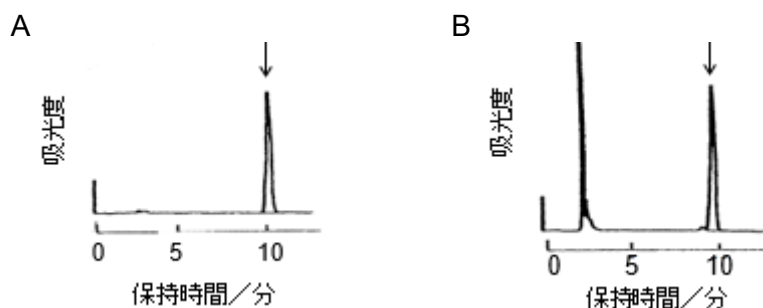
2 リン酸二水素カリウム 6.8 g (6.75~6.84 g) を水に溶かして 1 L とし、リン酸 (1+10) で pH を 3.2~3.4 に調整する。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
鶏用プレミックス1	6	3	97.0	3.8
	12	3	99.5	2.1
	60	3	95.7	1.0
鶏用プレミックス2	6	3	96.9	3.5
	12	3	97.4	0.8
	60	3	94.7	1.5
鶏用プレミックス3	6	3	97.5	2.8
	12	3	98.1	1.5
	60	3	97.9	1.2

(参考) クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液 (スルファキノキサリンとして 5 μg/mL)

B：添加試料 (鶏用プレミックスにスルファキノキサリンとして 12 g/kg 相当量添加)

(2) 配合飼料

A 試薬の調製

スルファキノキサリン標準液　スルファキノキサリン〔C₁₄H₁₂N₄O₂S〕 20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えてスルファキノキサリン標準原液を調製する（この液 1 mL は、スルファキノキサリンとして 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をアセトニトリル-水（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中にスルファキノキサリンとして 2.5~15 µg を含有する数点のスルファキノキサリン標準液を調製する。

B 定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水（4+1）100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　試料溶液及び各スルファキノキサリン標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検　　出　　器：紫外吸光光度検出器（測定波長：240 nm）

カ　　ラ　　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm）^{注1}

溶　　離　　液：リン酸緩衝液^{注2}-アセトニトリル（7+3）

流　　速　　：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計　　算　　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のスルファキノキサリン量を算出する。

注 1 Shodex C₁₈-5B（昭和電工製（販売終了））又はこれと同等のもの

2 リン酸二水素カリウム 6.8 g（6.75~6.84 g）を水に溶かして 1 L とし、リン酸（1+10）で pH を 3.2~3.4 に調整する。

(参考) 分析法バリデーション

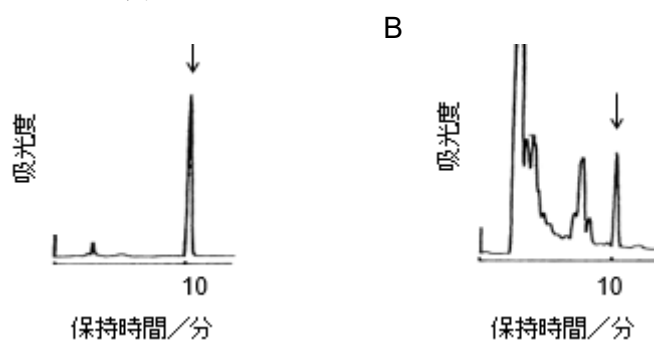
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
幼すう育成用配合飼料 (マッシュ)	30	3	97.7	1.4
	60	3	97.5	0.7
	120	3	96.9	1.5
中すう育成用配合飼料 (マッシュ)	30	3	96.8	1.5
	60	3	98.7	1.1
	120	3	97.8	1.0
ブロイラー肥育後期用配合飼料 (マッシュ)	30	3	96.7	0.3
	60	3	96.4	1.8
	120	3	97.9	0.8
中すう育成用配合飼料 (ペレット)	30	3	103	2.3
	60	3	107	2.0
	120	3	108	1.2

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
中すう育成用配合飼料	6	0	60	101	1.9	4.0	0.47

(参考) クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A: 標準液 (スルファキノキサリンとして 5 µg/mL)

B: 添加試料 (中すう育成用配合飼料にスルファキノキサリンとして 60 g/t 相当量添加)

11.2 微量定量試験法

11.2.1 液体クロマトグラフ法

A 試薬の調製

- 1) スルファキノキサリン標準液 スルファキノキサリン [C₁₄H₁₂N₄O₂S] 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えてスルファキノキサリン標準原液を調製する (この液 1 mL は、スルファキノキサリンとして 0.1 mg を含有する。)

使用に際して、標準原液の一部をリン酸緩衝液-アセトニトリル (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中にスルファキノキサリンとして 2.5~20 ng を含有する数点のスルファキノキサリン標準液を調製する。

- 2) リン酸緩衝液 リン酸水素二ナトリウム・12水 9.0 g (8.95~9.04 g) 及び

リン酸二水素カリウム 3.4 g (3.35~3.44 g) を水に溶かして 1 L とする。

- 3) フロレサミン液 フロレサミン 0.10 g (0.095~0.104 g) をアセトンに溶かして 25 mL とする。

B 定 量

抽 出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、量って 200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 試料溶液をオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg)^{注1}に入れ、初めの流出液 5 mL を捨てる。その後の流出液 5 mL を 50 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、更に標線までリン酸緩衝液を加え、蛍光化に供する試料溶液とする。

蛍光化 試料溶液 5 mL を試験管に正確に入れ、フロレサミン液 0.5 mL を正確に加えて混合した後 1 分間静置する。この液をメンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

同時に各スルファキノキサリン標準液各 5 mL をそれぞれ試験管に正確に入れ、試料溶液と同様に蛍光化し、液体クロマトグラフィーに供する標準液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器 (励起波長：410 nm、蛍光波長：490 nm)

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.0 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm)^{注2}

溶 離 液：リン酸緩衝液-メタノール (1+1)

流 速：0.7 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のスルファキノキサリン量を算出する。

注 1 Sep-Pak Plus C₁₈ Cartridge (Waters 製) に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

2 Nucleosil 5C₁₈ (Macherey-Nagel 製) 又はこれと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

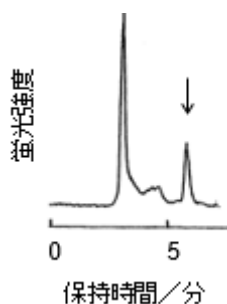
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
成鶏用プレミックス	0.5	3	101	2.5
	1	3	95.0	1.8
肉豚用プレミックス	0.5	3	98.3	4.8
	1	3	97.0	6.4
牛用プレミックス	0.5	3	97.7	4.3
	1	3	103	6.5
成鶏飼育用配合飼料	0.5	3	90.3	5.0
肉豚肥育用配合飼料	0.5	3	97.0	5.2
肉用牛肥育用配合飼料	0.5	3	91.0	3.8

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
鶏用プレミックス	6	0	0.5	95.7	5.3	5.9	0.33
成鶏飼育用配合飼料	6	0	0.5	89.0	6.7	8.9	0.49

(参考) クロマトグラム例



添加試料 (成鶏飼育用配合飼料にスルファキノキサリンとして 0.5 g/t 相当量添加) のクロマトグラム

12 デコキネート

12.1 定量試験法

12.1.1 液体クロマトグラフ法

(1) プレミックス

A 試薬の調製

- 抽出溶媒 塩化カルシウム 10 g (9.5~10.4 g) をメタノールに溶かして 1 L とする。
- デコキネート標準液 デコキネート [C₂₄H₃₅NO₅] 40 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、抽出溶媒を加えて溶かし、更に標線まで抽出溶媒を加えてデコキネート標準原液を調製する (この液 1 mL は、デコキネートとして 0.4 mg を含有する。)。
使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にデコキネートとして 1~8 µg を含有する数点のデコキネート標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 2~5 g (デコキネートとして 20~50 mg 相当量) を 0.001

g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、40 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一部をメタノールで正確に希釈する。この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各デコキネート標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検出器：蛍光検出器（励起波長：326 nm、蛍光波長：384 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 3.9 mm、長さ 300 mm、粒径 10 μm）^{注1}

溶離液：塩化カルシウム 0.10 g（0.095~0.104 g）をメタノール-水（9+1）に溶かして 1 L とする。

流速：1.0 mL/min

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のデコキネート量を算出する。

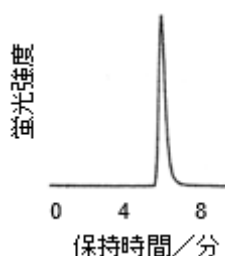
注 1 μBondapak C₁₈（Waters 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
幼すう用プレミックス	5	3	103	3.9
	10	3	110	3.3
	20	3	106	3.4
中すう用プレミックス	5	3	105	1.5
	10	3	105	4.7
	20	3	105	1.0
ブロイラー用プレミックス	5	3	101	3.5
	10	3	102	3.5
	20	3	103	0.6

（参考）クロマトグラム例



添加試料（プレミックス）のクロマトグラム

(2) 配合飼料

A 試薬の調製

- 1) 抽出溶媒 メタノール-クロロホルム（9+1）
- 2) デコキネート標準液 (1)の A の 2)による。

B 定 量

抽出 分析試料 5~20 g (デコキネートとして 0.2~0.8 mg 相当量) を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、40 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をメンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー (1)の B の液体クロマトグラフィーの項による。

計 算 (1)の B の計算の項による。

(参考) 分析法バリデーション

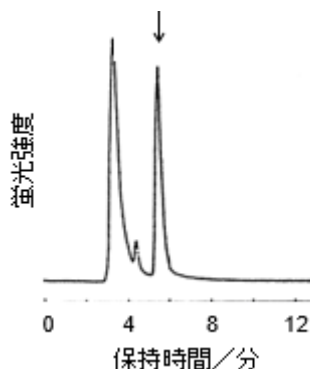
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
幼すう用配合飼料	20	3	98.3	6.8
	30	3	106	1.1
	40	3	103	7.4
中すう用配合飼料	20	3	106	2.4
	30	3	103	5.1
	40	3	105	1.5
ブロイラー用配合飼料	20	3	99.3	1.5
	30	3	99.3	5.0
	40	3	95.3	5.8

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
中すう用配合飼料	6	0	40	99.7	2.4	2.4	0.27

(参考) クロマトグラム例



添加試料 (配合飼料) のクロマトグラム

12.1.2 蛍光光度法

(1) プレミックス

A 試薬の調製

- 1) 抽出溶媒 塩化カルシウム 10.0 g (9.95~10.04 g) をメタノールに溶かして 1 L とする。
- 2) デコキネート標準液 デコキネート [C₂₄H₃₅NO₅] 30 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、抽出溶

媒を加えて溶かし、更に標線まで抽出溶媒を加えてデコキネート標準原液を調製する（この液 1 mL は、デコキネートとして 0.3 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にデコキネートとして 6 µg を含有するデコキネート標準液を調製する。

- 3) ケイ酸マグネシウム 合成ケイ酸マグネシウム（粒径 74~149 µm（200~100 メッシュ）^{注1}）を 120 °C で 3 時間乾燥する。

B 定 量

抽 出 分析試料 1~2 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 50 mL を加え、20 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を抽出溶媒で正確に 50~500 倍に希釈する。

この希釈液 10 mL 及びクロロホルム 10 mL を 200 mL の分液漏斗に正確に入れ、更に塩酸（1+19）100 mL を加えて振り混ぜた後 15 分間静置する。クロロホルム層（下層）を共栓試験管に入れ、適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、カラム処理に供する試料溶液とする。

同時に、デコキネート標準液 10 mL を 200 mL の分液漏斗に正確に入れ、同様に操作し、カラム処理に供する標準液とする。

カラム処理 ケイ酸マグネシウム 0.5 g（0.45~0.55 g）を 3 本のカラム管（内径 7 mm）にそれぞれ乾式で充てんし、更に硫酸ナトリウム（無水）0.2 g（0.18~0.22 g）をそれぞれに積層してカラムを調製する。

試料溶液 5 mL を第 1 のカラムに正確に入れ、標準液 5 mL を第 2 のカラムに正確に入れ、クロロホルム 5 mL を第 3 のカラムに入れる。

液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させた後、メタノール 10 mL をそれぞれのカラムに加えて同様に流出させる。

20 mL の試験管をそれぞれのカラムの下に置き、抽出溶媒 15 mL をそれぞれ第 1 及び第 2 のカラムに加えてデコキネートを溶出させ、測定に供する試料溶液及び標準液とする。

同時に、第 3 のカラムについて同様に操作して空試験液とする。

測 定 試料溶液、標準液及び空試験液について励起波長 330 nm 及び蛍光波長 390 nm で蛍光強度を測定する。

計 算 得られた蛍光強度から、試料中のデコキネート量を算出する。

注 1 フロリジル（Floridin 製）又はこれと同等のもの

(2) 配合飼料

A 試薬の調製

(1)の A による。

B 定 量

抽 出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 50 mL を加え、20 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 5 分間遠心分離する。

上澄み液 10 mL 及びクロロホルム 10 mL を 200 mL の分液漏斗に正確に入れ、更に塩酸 (1+19) 100 mL を加えて振り混ぜた後 15 分間静置する。クロロホルム層 (下層) を共栓試験管に入れ、適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、カラム処理に供する試料溶液とする。

同時に、デコキネート標準液 10 mL を 200 mL の分液漏斗に正確に入れ、同様に操作してカラム処理に供する標準液とする。

カラム処理 (1)の B のカラム処理の項による。

測定 (1)の B の測定の項による。

計算 (1)の B の計算の項による。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
養鶏用配合飼料	20	6	93.1	3.0
	30	6	92.0	2.4
	40	6	94.1	2.6

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
配合飼料	6	0	40	86.1	2.7	5.4	0.58

12.2 微量定量試験法

12.2.1 液体クロマトグラフ法

(1) プレミックス

A 試薬の調製

- 1) 塩化カルシウム-メタノール液 11.1.2 の(1)の A の 1)による。
- 2) デコキネート標準液 デコキネート [C₂₄H₃₅NO₅] 40 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、塩化カルシウム-メタノール液を加えて溶かし、更に標線まで塩化カルシウム-メタノール液を加えてデコキネート標準原液を調製する (この液 1 mL は、デコキネートとして 0.4 mg を含有する。)。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にデコキネートとして 5~40 ng を含有する数点のデコキネート標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、クロロホルム 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液をあらかじめ適量の硫酸ナトリウム (無水) をのせた分液ろ紙でろ過し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 シリカゲルミニカラム (690 mg) ^{注1} をクロロホルム 10 mL で洗浄する。

試料溶液 10 mL をミニカラムに正確に入れ、圧注^{注2}して流出させる。ク

ロロホルム 10 mL をミニカラムに加え、同様に流出させ、ミニカラムを洗浄する。10 mL の褐色全量フラスコをミニカラムの下に置き、メタノール 8 mL をミニカラムに加え、圧注^{注2}してデコキネートを溶出させる。更に全量フラスコの標線までメタノールを加え、この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各デコキネート標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器（励起波長：326 nm、蛍光波長：384 nm）

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm）^{注3}

溶 離 液：塩化カルシウム 1.0 g（0.95~1.04 g）をメタノール-水（4+1）に溶かして 1 L とする。

流 速：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さを求めて検量線を作成し、試料中のデコキネート量を算出する。

注 1 Sep-Pak Plus Silica Cartridge（Waters 製）に適切な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

2 流速は 2~5 mL/min とする。

3 Wakosil 5C18HG（和光純薬工業製（販売終了））又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

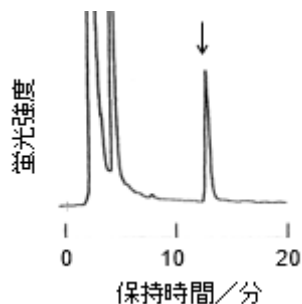
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
ブロイラー仕上げ用プレミックス	0.2	3	100	3.8
	0.5	3	92.7	2.2
	0.8	3	96.7	4.2
子豚育成用プレミックス	0.2	3	107	3.0
	0.5	3	101	8.9
	0.8	3	98.0	8.2
牛用プレミックス	0.2	3	104	8.5
	0.5	3	103	6.5
	0.8	3	101	9.2

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
成鶏用プレミックス	6	0	0.5	97.0	6.4	7.1	0.40

(参考) クロマトグラム例



添加試料（子豚育成用プレミックス）のクロマトグラム

(2) 配合飼料

A 試薬の調製

- 1) 塩化カルシウム-メタノール液 11.1.2の(1)のAの1)による。
- 2) デコキネート標準液 (1)のAの2)によりデコキネート標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にデコキネートとして 0.025~0.4 μg を含有する数点のデコキネート標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 50 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、クロロホルム 200 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液をあらかじめ適量の硫酸ナトリウム（無水）をのせた分液ろ紙でろ過し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 (1)のBのカラム処理の項による。

液体クロマトグラフィー (1)のBの液体クロマトグラフィーの項による。

計 算 (1)のBの計算の項による。

(参考) 分析法バリデーション

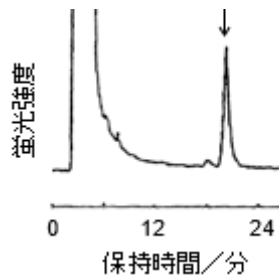
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
成鶏用配合飼料	0.1	3	91.0	2.9
	0.3	3	99.0	10
	0.8	3	90.3	3.2
ブロイラー仕上げ用配合飼料	0.1	3	97.0	4.7
	0.3	3	98.3	10
	0.8	3	94.3	11
肉豚用配合飼料	0.1	3	94.7	6.2
	0.3	3	101	15
	0.8	3	89.7	8.5
乳用牛用配合飼料	0.1	3	97.3	7.6
	0.3	3	94.0	7.4
	0.8	3	102	5.5

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
プロイラー仕上げ用配合飼料	6	0	0.1	96.8	5.7	9.0	0.41

(参考) クロマトグラム例



添加試料（乳用牛配合飼料にデコキネートとして
0.1 g/t 相当量添加）のクロマトグラム

13 ナイカルバジン

13.1 定量試験法

13.1.1 液体クロマトグラフ法

(1) プレミックス

A 試薬の調製

ナイカルバジン標準液 ナイカルバジン [C₁₃H₁₀N₄O₅·C₆H₈N₂O] 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、500 mL の褐色全量フラスコに入れ、*N,N*-ジメチルホルムアミド 150 mL を加え、穏やかに加温しながら溶かした後放冷する。更に全量フラスコの標線まで *N,N*-ジメチルホルムアミドを加えてナイカルバジン標準原液を調製する（この液 1 mL は、ナイカルバジンとして 50 μg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を *N,N*-ジメチルホルムアミドで正確に希釈し、1 mL 中にナイカルバジンとして 1~20 μg を含有する数点のナイカルバジン標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 1~2 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、*N,N*-ジメチルホルムアミド 100 mL を加え、沸騰水浴中でときどき振り混ぜながら 15 分間加熱して抽出した後放冷する。

抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液を *N,N*-ジメチルホルムアミドで 50~100 倍に正確に希釈し、メンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各ナイカルバジン標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器（測定波長：347 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm）^{注1}

溶離液：メタノール-水（13+7）

流速：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

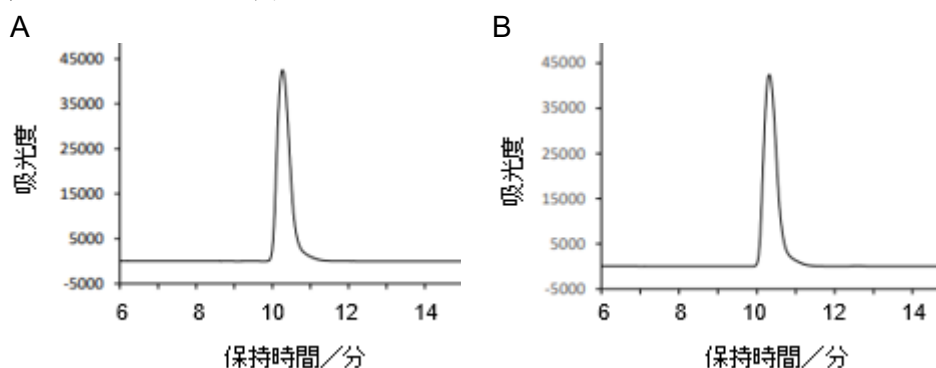
計算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のナイカルバジン量を算出する。

注1 Shodex C18M 4E（レゾナック製）又はこれと同等のもの
（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
幼すう用プレミックス	25	3	99.5	0.2
	50	3	99.6	0.7
	100	3	100	0.9
中すう用プレミックス	25	3	99.6	0.7
	50	3	99.7	1.1
	100	3	100	0.4
ブロイラー前期用プレミックス	25	3	99.6	0.4
	50	3	101	1.0
	100	3	100	0.5
ブロイラー後期用プレミックス	25	3	100	0.8
	50	3	100	0.7
	100	3	100	0.3
鶏用プレミックス1	2.5	5	92.5	2.4
	25	5	99.8	1.6
	50	5	92.7	1.1
鶏用プレミックス2	2.5	5	102	1.3
	25	5	100	0.6
	50	5	98.9	1.4
鶏用プレミックス3	2.5	5	97.6	3.9
	25	5	102	2.3
	50	5	97.0	2.6

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（ナイカルバジンとして 10 μg/mL）

B：添加試料（鶏用プレミックスにナイカルバジンとして 25 g/kg 相当量添加）

(2) 配合飼料

A 試薬の調製

ナイカルバジン標準液 (1)のAによる。

B 定 量

抽出 分析試料 5~10 g (ナイカルバジンとして 0.25~1 mg 相当量) を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、*N,N*-ジメチルホルムアミド 100 mL を加え、沸騰水浴中でときどき数秒間軽く振り混ぜながら 15 分間加熱して抽出した後放冷する。

抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液をメンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー (1)のBの液体クロマトグラフィーの項による。

計 算 (1)のBの計算の項による。

(参考) 分析法バリデーション

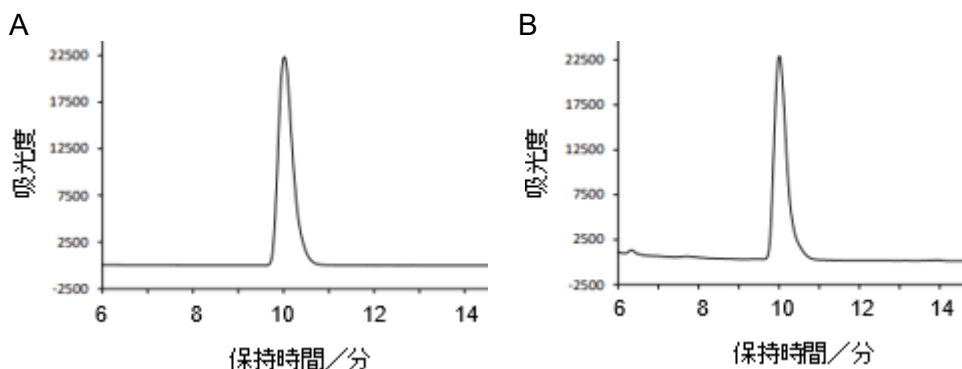
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
幼すう用配合飼料	100	3	99.7	0.9
	200	3	99.7	0.2
中すう用配合飼料	100	3	100	0.7
	200	3	99.1	1.4
ブロイラー前期用配合飼料1	100	3	99.7	1.3
	125	3	98.3	0.2
ブロイラー後期用配合飼料1	100	3	99.1	0.2
	125	3	99.0	0.5
ブロイラー前期用配合飼料2	25	5	101	3.6
	50	5	103	7.1
	75	5	102	5.6
ブロイラー前期用配合飼料3	25	5	110	5.3
	50	5	101	2.5
	75	5	98.7	4.3
ブロイラー後期用配合飼料2	25	5	108	5.6
	50	5	109	5.3
	75	5	106	2.4

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	表示量 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー前期用配合飼料	6	0	125	101	2.1	2.3	0.30

(参考) クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A : 標準液 (ナイカルバジンとして 5 $\mu\text{g/mL}$)

B : 添加試料 (ブロイラー前期用配合飼料にナイカルバジンとして 50 g/t 相当量添加)

13.1.2 吸光光度法

(1) プレミックス

A 試薬の調製

1) ナイカルバジン標準液 12.1.1 の A の 1)によりナイカルバジン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一部を *N,N*-ジメチルホルムアミドで正確に希釈し、1 mL 中にナイカルバジンとして 12.5 μg を含有するナイカルバジン標準液を調製する。

2) 塩基性アルミナ カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ (粒径 63~200 (230~70 メッシュ) ^{注1}を 105 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間乾燥する。

3) 水酸化ナトリウム溶液 水酸化ナトリウム 50.0 g (49.95~50.04 g) を水 50 mL に溶かし、上澄み液を用いる (容器を密栓して保存する。)

4) 水酸化ナトリウム・エタノール溶液 水酸化ナトリウム溶液 2 mL にエタノールを加えて 100 mL とし、遠心分離して上澄み液を用いる (使用時に調製する。)

B 定 量

抽 出 分析試料 1~2 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、*N,N*-ジメチルホルムアミド 100 mL を加え、ゆるく栓をして熱板上でときどき数秒間軽く振り混ぜながら沸騰直前まで加熱して抽出した後放冷する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、650 \times g で 3 分間遠心分離する。上澄み液を *N,N*-ジメチルホルムアミドで正確に 50~500 倍に希釈し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 塩基性アルミナ 30 g (29.5~30.5 g) をカラム管 (内径 22 mm) に乾式で充てんし、上端にガラスウールを軽く詰める。*N,N*-ジメチルホルムアミドをこのカラムに入れ、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させ、カラムを調製する。

試料溶液 25 mL をカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させる。更に *N,N*-ジメチルホルムアミド 30 mL 及びエタノール 20 mL を順次カラムに加えて同様に流出させる。

50 mL の全量フラスコをカラムの下に置き、エタノール 40 mL をカラムに加えてナイカルバジン を溶出させる。更に全量フラスコの標線までエタノールを加え、測定に供する試料溶液とする。

同時にナイカルバジン標準液 25 mL について、試料溶液の場合と同様に操作し、測定に供する標準液とする。

測定 試料溶液 15 mL をそれぞれ 25 mL の全量フラスコ A 及び B に正確に入れ、全量フラスコ A に水酸化ナトリウム・エタノール溶液 5 mL を加えて発色させ、更に標線までエタノールを加える。

全量フラスコ B の標線までエタノールを加えて振り混ぜ、全量フラスコ A 液について全量フラスコ B 液を対照液として波長 430 nm の吸光度を測定する。

同時に、標準液 10~20 mL の間の数点をそれぞれ 25 mL の全量フラスコに正確に入れ、それぞれに水酸化ナトリウム・エタノール溶液 5 mL を加えて発色させ、標線までエタノールを加え、各液についてエタノールを対照液として波長 430 nm の吸光度を測定する。

計算 得られた吸光度から検量線を作成し、試料中のナイカルバジン量を算出する。

注 1 Aluminium oxide active basic Art.1076 (Merck 製) 又はこれと同等のもの

(2) 配合飼料

A 試薬の調製

(1)の A による。

B 定量

抽出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、*N,N*-ジメチルホルムアミド 100 mL を加え、ゆるく栓をして熱板上でときどき数秒間軽く振り混ぜながら沸騰直前まで加熱して抽出した後放冷する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 3 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 (1)の B のカラム処理の項による。

測定 (1)の B の測定の項による。

計算 (1)の B の計算の項による。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
養鶏用配合飼料	100	6	96.8	2.6
	150	6	96.0	2.0
	200	6	96.6	1.8

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	表示量 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
配合飼料	6	0	125	93.1	4.7	4.7	0.60

13.2 微量定量試験法

13.2.1 液体クロマトグラフ法

(適用範囲：配合飼料)

A 試薬の調製

- 1) ナイカルバジン標準液 ナイカルバジン [C₁₃H₁₀N₄O₅·C₆H₈N₂O] 10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノール-アセトニトリル (7+3) 100 mL を加えて穏やかに加温しながら溶かした後放冷する。更に全量フラスコの標線までメタノール-アセトニトリル (7+3) を加えてナイカルバジン標準原液を調製する (この液 1 mL は、ナイカルバジンとして 50 µg を含有する。)

使用に際して、標準原液の一部をメタノール-アセトニトリル (7+3) で正確に希釈し、1 mL 中にナイカルバジンとして 0.1~5 µg を含有する数点のナイカルバジン標準液を調製する。

- 2) 塩基性アルミナ 7.2.1 の A の 2)による。

B 定 量

抽出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の分液漏斗に入れ、アセトニトリル 200 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。抽出液をろ紙 (2 種) でろ過し、精製に供する試料溶液とする。

精製 試料溶液 100 mL を 300 mL の分液漏斗に正確に入れ、アセトニトリル飽和ヘキサン 75 mL を加え、10 分間振り混ぜた後静置し、アセトニトリル層 (下層) を 300 mL のなす形フラスコに入れる。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する。

テトラヒドロフラン 20 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する。

カラム処理 塩基性アルミナ 4 g (3.6~4.4 g) をテトラヒドロフランに懸濁させてカラム管 (内径 10 mm) に流し込み、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させ、カラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをテトラヒドロフラン 3 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させる。テトラヒドロフラン

10 mL をカラムに加え、同様に流出させ、カラムを洗浄する。100 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、テトラヒドロフラン-メタノール (9+1) 60 mL をカラムに加えてナイカルバジンを溶出させる。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

メタノール-アセトニトリル (7+3) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、この液をメンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各ナイカルバジン標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器 (測定波長：340 nm)
 カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm) 注1
 溶 離 液：水-アセトニトリル (1+1)
 流 速：1.0 mL/min
 カラム槽温度：40 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のナイカルバジン量を算出する。

注 1 Wakosil 5C18-200 (富士フイルム和光純薬製) 又はこれと同等のもの (参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

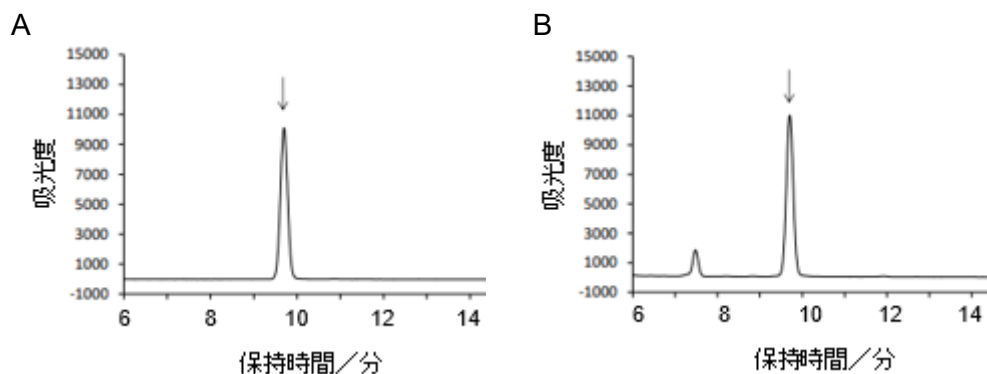
試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
成鶏飼育用配合飼料 ^注	0.1	3	103	1.5
	0.5	3	109	2.7
	1	3	106	1.5
肉豚肥育用配合飼料 ^注	0.1	3	104	9.0
	0.5	3	107	1.6
	1	3	103	5.4
肉用牛肥育用配合飼料 ^注	0.1	3	101	6.2
	0.5	3	108	6.2
	1	3	102	6.2
成鶏飼育用配合飼料2	0.1	5	104	2.0
	0.5	5	109	1.6
肉豚肥育用配合飼料2	0.1	5	101	3.0
	0.5	5	99.7	2.3
種牛飼育用配合飼料	0.1	5	104	0.5
	0.5	5	104	1.1

・共同試験^注

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
成鶏飼育用配合飼料	6	0	0.1	106	8.9	14	0.65

注 アセトニトリルで調製したナイカルバジン標準液を用い、得られたクロマトグラムからピーク高さを求めて検量線を作成し、試料中のナイカルバジン量を算出した。

(参考) クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A : 標準液 (ナイカルバジンとして 1.25 $\mu\text{g/mL}$)

B : 添加試料 (成鶏用配合飼料にナイカルバジンとして 0.5 g/t 相当量添加)

14 ハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウム

14.1 定量試験法

14.1.1 液体クロマトグラフ法

(1) プレミックス

A 試薬の調製

臭化水素酸ハロフジノン標準液 臭化水素酸ハロフジノン
〔 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{Br}_2\text{ClN}_3\text{O}_3$ 〕 20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、
200 mL の全量フラスコに入れ、塩酸 (0.1 mol/L) を加えて溶かし、更に標
線まで同液を加えて臭化水素酸ハロフジノン標準原液を調製する (この液 1
mL は、臭化水素酸ハロフジノンとして 0.1 mg を含有する。)

使用に際して、標準原液の一部を塩酸 (0.1 mol/L) で正確に希釈し、1
mL 中に臭化水素酸ハロフジノンとして 0.5~5 μg を含有する数点の臭化水素
酸ハロフジノン標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 2.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100
mL の共栓三角フラスコに入れ、酢酸ブチル 25 mL 及び硝酸 (2+3) 50 mL
を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。硝酸層 (下層) を遠心沈殿管に入れ、
1,500 \times g で 5 分間遠心分離する。上澄み液 2 mL をあらかじめ炭酸カルシウ
ム 0.5 g (0.45~0.54 g) 及び水 15 mL を入れた 50 mL の全量フラスコに正確
に加えた後 30 分間静置する。更に全量フラスコの標線まで水を加え、この
液をメンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、液体クロマトグ
ラフに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各臭化水素酸ハロフジノン標準液
各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器 : 紫外吸光光度検出器 (測定波長 : 243 nm)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm）^{注1}

溶離液：酢酸緩衝液^{注2}－メタノール（11+9）

流速：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、次式により試料中のハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウム量（C（g/kg））を算出する。

$$C = \frac{A \times 3,125}{8.5}$$

A：検量線から求めた臭化水素酸ハロフジノンの質量（ng）

注1 Wakosil 5C18-200（富士フィルム和光純薬製）又はこれと同等のもの

注2 酢酸アンモニウム 4.85 g（4.845~4.854 g）及び酢酸 7.5 mL を水に溶かして 1 L とし、酢酸で pH を 4.3 に調整したもの

（参考）分析法バリデーション

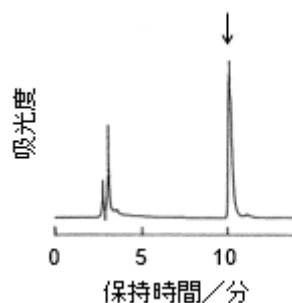
・ 添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
幼すう用プレミックス	0.5	3	92.7	2.2
	2.5	3	93.9	5.1
	5	3	93.9	2.1
中すう用プレミックス	0.5	3	92.2	2.0
	2.5	3	89.9	8.5
	5	3	95.0	1.8
ブロイラー前期用プレミックス	0.5	3	87.4	1.7
	2.5	3	92.9	3.8
	5	3	94.4	4.8

・ 共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー肥育前期用プレミックス	7	0	25	97.4	3.0	3.7	1.1

（参考）クロマトグラム例



標準液（臭化水素酸ハロフジノンとして 100 ng 注入）のクロマトグラム

(2) 配合飼料

A 試薬の調製

臭化水素酸ハロフジノン標準液

(1)の A により臭化水素酸ハロフジノン標

準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一部を塩酸（0.1 mol/L）で正確に希釈し、1 mL 中に臭化水素酸ハロフジノンとして 0.4~1.2 µg を含有する数点の臭化水素酸ハロフジノン標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、酢酸エチル 20 mL 及び炭酸ナトリウム溶液（1 w/v%）10 mL を加え、15 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を 1,500×g で 10 分間遠心分離し、酢酸エチル層（上層）を 300 mL の分液漏斗に入れる。

先の遠心沈殿管に酢酸エチル 20 mL を加え、同様に操作し、酢酸エチル層を先の分液漏斗に合わせる。更に同様に 4 回操作し、酢酸エチル層を先の分液漏斗に合わせて精製に供する試料溶液とする。

精 製 試料溶液に塩酸（0.1 mol/L）10 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層（下層）を 200 mL のなす形フラスコに入れる。残留液に塩酸（0.1 mol/L）10 mL を加えて同様に操作し、水層を先のなす形フラスコに合わせる。水層を 50 °C 以下の水浴で約 5 mL まで減圧濃縮した後、20 mL の全量フラスコに入れる。先のなす形フラスコを少量の塩酸（0.1 mol/L）で洗浄し、洗液を先の全量フラスコに合わせる。更に全量フラスコの標線まで塩酸（0.1 mol/L）を加え、この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー (1)の B の液体クロマトグラフィーの項による。

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、次式により試料中のハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウム量（C (g/t)）を算出する。

$$C = A \times \frac{20}{8.5}$$

A : 検量線から求めた臭化水素酸ハロフジノンの質量 (ng)

(参考) 分析法バリデーション

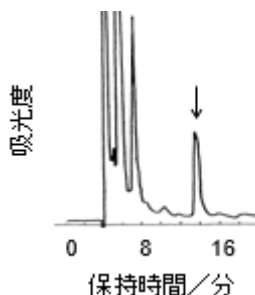
- ・ 添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返 し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
ブロイラー前期用配合飼料	40	3	80.2	7.3
ブロイラー後期用配合飼料	40	3	81.0	5.6
幼すう用配合飼料	40	3	83.1	7.9

- ・ 共同試験

試料の種類	有効試 験室数	棄却試 験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー後期用配合飼料	7	0	40	78.2	4.5	5.1	0.54

(参考) クロマトグラム例



添加試料 (幼すう育成用配合飼料にハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムとして 40 g/t 相当量添加) のクロマトグラム

14.2 微量定量試験法

14.2.1 液体クロマトグラフ法

(適用範囲：配合飼料)

A 試薬の調製

- 1) 臭化水素酸ハロフジノン標準液 13.1.1 の(1)の A により臭化水素酸ハロフジノン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一部を塩酸 (0.1 mol/L) で正確に希釈し、1 mL 中に臭化水素酸ハロフジノンとして 0.1~0.8 μg を含有する数点の臭化水素酸ハロフジノン標準液を調製する。

- 2) 酢酸緩衝液 酢酸アンモニウム 4.9 g (4.85~4.94 g) 及び酢酸 7.5 mL を水に溶かして 1 L とし、酢酸で pH を 4.3 に調整する。

B 定 量

抽出 分析試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、酢酸エチル 20 mL 及び炭酸ナトリウム (1 w/v%) 溶液 10 mL を加え、15 分間振り混ぜた後、1,500 \times g で 10 分間遠心分離し、酢酸エチル層 (上層) を 300 mL の分液漏斗に入れる。

先の遠心沈殿管に酢酸エチル 20 mL を加え、同様に操作し、酢酸エチル層を先の分液漏斗に合わせる。更に同様に 4 回操作し、酢酸エチル層を先の分液漏斗に合わせて精製に供する試料溶液とする。

精製 試料溶液に塩酸 (0.1 mol/L) 10 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層 (下層) を 100 mL のなす形フラスコに入れる。残留液に塩酸 (0.1 mol/L) 10 mL を加え、同様に操作する。水層を 50 $^{\circ}\text{C}$ 以下の水浴で約 5 mL まで減圧濃縮し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) ^{注1} をメタノール 10 mL 及び水 10 mL で順次洗浄する。

試料溶液をカラムに入れ、液面が充てん剤の上端から 1 mm の高さに達するまで流出させた後、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、同様に流出させる。水 5 mL、メタノール-水 (3+2) 各 5 mL (2 回) 及び塩酸 (0.1 mol/L) 各 5 mL (4 回) を順次カ

ラムに加え、洗浄する。

50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、メタノール-クロロホルム (9+1) 10 mL をカラムに加えてハロフジノンを溶出させる。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する。

水-アセトニトリル-酢酸緩衝液 (62+23+15) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、この液をメンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各臭化水素酸ハロフジノン標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器 (測定波長：243 nm)

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 3.9 mm、長さ 300 mm、粒径 10 μm) 注2

溶 離 液：水-アセトニトリル-酢酸緩衝液 (62+23+15)

流 速：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、次式により試料中のハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウム量 (C (g/t)) を算出する。

$$C = A \times \frac{1}{8.5}$$

A：検量線から求めた臭化水素酸ハロフジノンの質量 (ng)

注 1 Mega Bond Elut C18 (Agilent Technologies 製、リザーバー容量 6 mL)

又はこれと同等のもの

2 μBondapak C18 (Waters 製) 又はこれと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

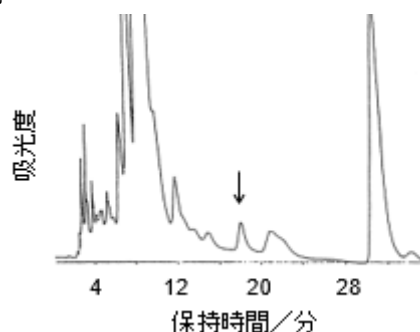
・ 添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
成鶏飼育用配合飼料	0.3	3	86.0	6.0
	0.5	3	90.0	3.3
	1	3	92.5	2.0
ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.3	3	87.1	5.5
	0.5	3	85.9	6.3
	1	3	92.6	8.4
肉豚肥育用配合飼料	0.3	3	87.2	7.4
	0.5	3	95.1	2.8
	1	3	96.1	3.3

・ 共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
成鶏飼育用配合飼料	7	0	0.5	99.8	13	14	0.80

(参考) クロマトグラム例



添加試料（成鶏飼育用配合飼料にハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムとして0.5 g/t 相当量添加）のクロマトグラム

15 フラゾリドン

15.1 吸光光度法

A 試薬の調製

- 1) フラゾリドン標準液 フラゾリドン $[C_8H_7N_3O_5]$ 0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、*N,N*-ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、更に標線まで *N,N*-ジメチルホルムアミドを加えてフラゾリドン標準原液を調製する（この液 1 mL は、フラゾリドンとして 1 mg を含有する）。

使用に際して、標準原液の一部を *N,N*-ジメチルホルムアミドで正確に希釈し、1 mL 中にフラゾリドンとして 0.1 mg を含有するフラゾリドン標準液を調製する。

- 2) カラム充てん剤 カラムクロマトグラフ用アルミナ（粒径 63~200 μm （230~70 メッシュ）^{注1} 100 g（99.5~100.4 g）に酸化マグネシウム 4.0 g（3.95~4.04 g）を加えて混和し、更に水 5 mL を加えて混和する。
- 3) 発色試薬 塩酸フェニルヒドラジニウム 0.20 g（0.195~0.204 g）を水に溶かして 20 mL とし、更に塩酸（10 mol/L）20 mL を加える（使用時に調製する。）。
- 4) 還元剤溶液 ハイドロサルファイトナトリウム 2.0 g（1.95~2.04 g）を水に溶かして 100 mL とする（使用時に調製する。）。

B 定 量

抽出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色三角フラスコに入れ、*N,N*-ジメチルホルムアミド 50 mL を加え、沸騰水浴中で 5 分間加熱した後、5 分間振り混ぜて抽出する。抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過し、ろ液を等量の水で希釈してカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 カラム充てん剤 25 g（24.5~25.5 g）をカラム管（内径 20 mm）に乾式で充てんし、カラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、初めの流出液 5 mL を捨て、その後の流出液を測定に供する試料溶液とする。

同時に、フラゾリドン標準液 5 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、*N,N*-ジメチルホルムアミド 45 mL 及び水 50 mL を加え、以下試料溶液の場合と同様の操作を行い、測定に供する標準液とする。

測定 試料溶液 5 mL を 30 mL の共栓試験管 A 及び B にそれぞれ正確に入れ、同時に標準液 5 mL を 30 mL の共栓試験管 C 及び D にそれぞれ正確に入れる。

試験管 B 及び D に還元剤溶液 2~3 滴をそれぞれ加え、5 分間振り混ぜた後、20 分間静置して還元させる。

次に、各試験管に発色試薬 5 mL をそれぞれ加えて振り混ぜ、70 °C の水浴中で 25 分間加熱して発色させる。

各試験管を冷却し、トルエン 10 mL をそれぞれ正確に加え、5 分間振り混ぜた後 30 分間静置し、各トルエン層（上層）について波長 440 nm の吸光度を測定する。

計算 得られた吸光度から、試料中のフラゾリドン量を算出する。

注 1 Aluminium oxide 90 standardized Art.1097 (Merck 製) 又はこれと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
成鶏飼育用配合飼料	55	3	101	2.9

・共同試験

試料の種類	試験室数	測定値 (g/t)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
配合飼料	6	39.2	5.8	11.5	1.25

16 フルメキン

16.1 オキシリン酸及びフルメキンの液体クロマトグラフによる同時分析法
第 2 節 1 による。

17 マラカイトグリーン (マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン)

17.1 マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法 (その 1 魚粉及び配合飼料)
第 2 節 3 による。

17.2 マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法 (その 2 魚油)
第 2 節 4 による。

18 メチレンブルー

18.1 クリスタルバイオレット及びメチレンブルー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
第 2 節 2 による。

19 ロイコマラカイトグリーン

19.1 マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法
第2節3による。

19.2 マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法（その2 魚油）
第2節4による。

第2節 多成分分析法

1 オキソリン酸及びフルメキンの液体クロマトグラフによる同時分析法

- (1) 分析対象化合物 オキソリン酸及びフルメキン (2成分)
- (2) 分析法

A 試薬の調製

- 1) オキソリン酸標準原液 オキソリン酸 [$C_{13}H_{11}NO_5$] 10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、水酸化ナトリウム溶液 (0.1 mol/L) 1 mL 及びメタノールを加え、超音波処理して溶かし、更に標線までメタノールを加えてオキソリン酸標準原液を調製する (この液 1 mL は、オキソリン酸として 0.1 mg を含有する。)
- 2) フルメキン標準原液 フルメキン [$C_{14}H_{12}FNO_3$] 10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてフルメキン標準原液を調製する (この液 1 mL は、フルメキンとして 0.1 mg を含有する。)
- 3) 混合標準液 オキソリン酸及びフルメキン標準原液の一部を混合し、水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、1 mL 中にオキソリン酸及びフルメキンとしてそれぞれ 0.01~5 μ g を含有する数点の混合標準液を調製する。
- 4) 溶出溶媒 アセトニトリル-トルエン (3+1) 1,000 mL にギ酸 2 mL を加える。

B 定 量

抽出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 20 mL を加え、30 分間静置する。更に 0.2 %メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) を 100 mL 加え、30 分間振り混ぜて抽出する。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 0.2 %メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。更に全量フラスコの標線まで 0.2 %メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) を加える。この液 4 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 10 mL を加え、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) ^{注1} をアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、圧注^{注2}して液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。

先のミニカラムの下に、あらかじめアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄したグラファイトカーボンミニカラム (300 mg) ^{注3} を連結する。試料溶液の入っていたなす形フラスコを 0.2 v/v%ギ酸溶液-アセトニトリル (1+1) 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、圧注^{注2}して液面が充てん剤の上端に達するまで流下してオキソリン酸及びフルメキンをグラファイトカーボンミニカラムに移行させる。

次に、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをはずし、50 mL のなし形フラスコをグラファイトカーボンミニカラムの下に置く。溶出溶媒 15 mL をグ

ラファイトカーボンミニカラムに加えてオキシリン酸及びフルメキンを溶出させる。

溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。水-メタノール (7+3) 2 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 (孔径 0.45 μm) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液^{注4}とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各混合標準液各 10 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器 (励起波長：325 nm、蛍光波長：365 nm)

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)^{注5}

溶 離 液：0.2 v/v%ギ酸溶液-メタノール (7+3) →15 min→ (4+6)
(5 min 保持)

流 速：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のオキシリン酸及びフルメキン量を算出する。

注 1 InertSep SlimJ C18-B (ジーエルサイエンス製) に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

2 流速は 1 mL/min とする。吸引マニホールドを使用してもよい。

3 InertSep GC (ジーエルサイエンス製、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの

4 試料溶液は褐色バイアル瓶に入れる。

5 L-column ODS (化学物質評価研究機構製) 又はこれと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

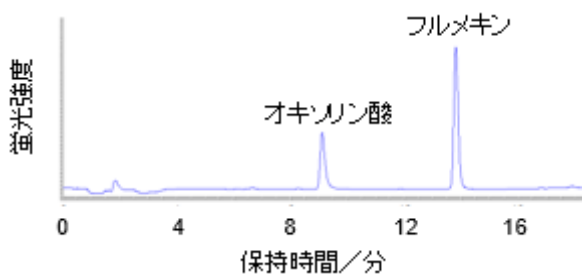
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
オキシリン酸	成鶏飼育用配合飼料	0.5	3	72.6	3.5
		1	3	81.8	7.3
		5	3	94.4	2.2
	まだい育成用配合飼料	1	3	74.5	2.4
		5	3	71.1	11
	魚粉1	0.5	3	77.7	12
		1	3	76.3	10
		5	3	90.8	3.8
	魚粉2	1	3	83.3	5.7
5		3	71.8	1.7	
魚粉3	1	3	78.2	1.5	
	5	3	80.3	3.6	
	5	3	80.3	3.6	
フルメキン	成鶏飼育用配合飼料	0.3	3	89.3	12
		0.5	3	78.9	6.8
		1	3	83.3	1.7
		5	3	90.5	2.5
		5	3	90.5	2.5
	まだい育成用配合飼料	1	3	74.2	2.6
		5	3	74.7	12
	魚粉1	0.3	3	77.5	11
		0.5	3	72.2	7.5
		1	3	71.5	1.4
		5	3	86.7	1.9
	魚粉2	1	3	85.3	16
		5	3	73.3	11
	魚粉3	1	3	82.0	2.7
		5	3	80.5	5.2
5		3	80.5	5.2	

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
オキシリン酸	成鶏飼育用配合飼料	8	0	3	88.7	4.1	8.3	0.59
	魚粉	8	0	3	83.0	6.1	9.5	0.68
フルメキン	成鶏飼育用配合飼料	8	0	3	87.7	5.5	6.9	0.50
	魚粉	8	0	3	82.0	4.1	8.3	0.59

- ・検出下限 (単一試験室による確認) オキシリン酸：試料中 0.5 g/t、フルメキン：試料中 0.3 g/t

(参考) クロマトグラム例



添加試料 (成鶏飼育用配合飼料にオキシリン酸及びフルメキンとして 5 g/t 相当量添加) のクロマトグラム

2 クリスタルバイオレット及びメチレンブルー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

- (1) 分析対象化合物 クリスタルバイオレット及びメチレンブルー (2成分)
- (2) 分析法^{注1}

A 試薬の調製

- 1) クリスタルバイオレット標準原液 クリスタルバイオレット [C₂₅H₃₀ClN₃] 10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてクリスタルバイオレット標準原液を調製する (この液 1 mL は、クリスタルバイオレットとして 100 µg を含有する。)
- 2) メチレンブルー標準原液 メチレンブルー [C₁₆H₁₈ClN₃S] 10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてメチレンブルー標準原液を調製する (この液 1 mL は、メチレンブルーとして 100 µg を含有する。)
- 3) 安定同位体標識物質標準原液及び混合内標準液 安定同位体標識クリスタルバイオレット^{注2} (CV-d₄) 5 mg 及び安定同位体標識メチレンブルー^{注2} (MB-d₆) 5 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、それぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えて各安定同位体標識物質標準原液を調製する (これらの液各 1 mL は、CV-d₄ 及び MB-d₆ として 100 µg をそれぞれ含有する。)
更に、各標準原液各 1 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (1+1) を標線まで加えて、1 mL 中に CV-d₄ 及び MB-d₆ としてそれぞれ 1 µg を含有する混合内標準液を調製する。
- 4) 検量線作成用標準液 使用に際して、クリスタルバイオレット及びメチレンブルー標準原液並びに混合内標準液の一部を混合し、アセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にクリスタルバイオレット及びメチレンブルーとしてそれぞれ 0.25~15 ng を含有し、かつ CV-d₄ 及び MB-d₆ としてそれぞれ 50 ng を含有する数点の検量線作成用標準液を調製する。
- 5) クエン酸-リン酸緩衝液 クエン酸一水和物 63.0 g (62.95~63.04 g) を水に溶かして 1,000 mL とした溶液に、リン酸三ナトリウム・12 水 228 g (227.5~228.4 g) を水に溶かして 1,000 mL とした溶液 110 mL 程度を加えて pH を 3.0 に調整する。
- 6) リン酸緩衝液 リン酸二水素カリウム 2.71 g (2.705~2.714 g) を水に溶かして 1,000 mL とし、水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) で pH を 7.0 に調整する。

B 定 量

抽出 分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、混合内標準液 5 mL 及びクエン酸-リン酸緩衝液 20 mL を加えた後 30 分間静置する。更にアセトニトリル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。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) で吸引ろ過する。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、更に全量フラスコの標線までアセトニトリルを加える。この液 4 mL を 100 mL の三角フラスコに正確に入れ、水 40 mL 及びリン酸緩衝液 5 mL を加えた後、水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) で pH を 7 に調整し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理^{注3} 弱酸性陽イオン交換体ミニカラム (1,000 mg)^{注4} をメタノール 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ^{注5}、液面が充填剤の上端に達するまで流下させる。試料溶液の入っていた三角フラスコをメタノール 5 mL で 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加えて同様に流出させる。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、メタノール-塩酸 (1,000+1) 10 mL をミニカラムに加えてクリスタルバイオレット、メチレンブルー、CV-d₄ 及び MB-d₆ を溶出させる。

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、窒素ガスを送って乾固する。アセトニトリル-水 (1+1) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 試料溶液及び各検量線作成用標準液各 10 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm)^{注6}
溶離液 : 5 mmol/L ヘプタフルオロ酪酸溶液-アセトニトリル (3+1) → 5 min → (9+11) (10 min 保持) → 0.01 min → (1+9) (6 min 保持) → 0.01 min → (3+1) (14 min 保持)

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部)^{注7}

検出器 : 四重極型質量分析計

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード)

ネブライザーガス : N₂ (340 kPa)

乾燥ガス : N₂ (350 °C)

キャピラリー電圧 : 4.0 kV

フラグメンター電圧 : 下表のとおり

コリジョンエネルギー : 下表のとおり

モニターイオン : 下表のとおり

表 各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサー	プロダクトイオン		フラグメンター	コリジョン
	イオン	定量用	確認用	電圧	エネルギー
	(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)	(V)	(eV)
クリスタルバイオレット	372	356	340	100	45
クリスタルバイオレット-d ₄	376	360	—	100	45
メチレンブルー	284	268	240	100	40
メチレンブルー-d ₆	290	274	—	100	40

計 算 得られた選択反応検出クロマトグラムからクリスタルバイオレット、メチレンブルー、CV-d₄ 及び MB-d₆ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のクリスタルバイオレット量及びメチレンブルー量を算出する。

注 1 定量操作は遮光した状態で行う。

2 安定同位体標識物質として用いるクリスタルバイオレット及びメチレンブルーは、クリスタルバイオレット-d₄ 及びメチレンブルー-d₆ (いずれも林純薬工業製) 又はこれらと同等のもの

3 流速は 1 mL/min 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。

4 Mega Bond Elut CBA (Agilent Technologies 製、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの

5 適当な容量のリザーバーを連結するとよい。

6 CAPCELLPAK C18 AQ (大阪ソーダ製) 又はこれと同等のもの

7 Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies 製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

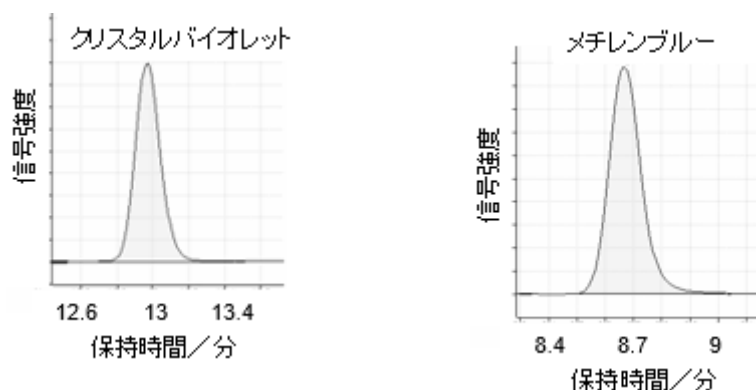
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
クリスタル バイオレット	成鶏飼育用配合飼料	0.005	3	109	2.4
		0.01	3	109	2.3
		0.1	3	103	0.5
	肉豚肥育用配合飼料	0.01	3	103	7.6
		0.1	3	103	0.5
		まだい育成用配合飼料	0.01	3	108
	国産魚粉	0.01	3	101	0.5
		0.005	3	116	1.1
		0.01	3	99.3	5.3
輸入魚粉	0.1	3	98.6	0.9	
	0.01	3	112	5.1	
	0.1	3	100	1.0	
メチレンブルー	成鶏飼育用配合飼料	0.005	3	114	5.5
		0.01	3	108	3.3
		0.1	3	106	0.6
	肉豚肥育用配合飼料	0.01	3	104	2.4
		0.1	3	105	2.0
		まだい育成用配合飼料	0.01	3	110
	国産魚粉	0.1	3	97.2	0.9
		0.005	3	112	2.0
		0.01	3	99.9	7.4
	輸入魚粉	0.1	3	101	2.9
		0.01	3	106	2.9
		0.1	3	105	0.8

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
クリスタル	成鶏飼育用配合飼料	8	0	0.02	94.5	3.4	7.5	0.34
バイオレット	まだい育成用配合飼料	8	0	0.04	101	2.1	3.1	0.14
	魚粉	8	0	0.08	99.1	0.83	3.2	0.15
メチレンブルー	成鶏飼育用配合飼料	8	0	0.02	83.5	2.2	13	0.59
	まだい育成用配合飼料	8	0	0.04	93.3	2.6	15	0.70
	魚粉	8	0	0.08	97.7	2.9	14	0.62

・検出下限（単一試験室による確認） 試料中 0.005 g/t

(参考) クロマトグラム例



添加試料（魚粉にクリスタルバイオレット及びメチレンブルーとして 0.1 g/t 相当量添加）のクロマトグラム

3 マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法（その1 魚粉及び配合飼料）

- (1) 分析対象化合物 マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン（2成分）
- (2) 適用範囲 魚粉及び配合飼料
- (3) 分析法^{注1}

A 試薬の調製

- 1) マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン標準原液^{注2} マラカイトグリーン [C₂₃H₂₅ClN₂] 10 mg 及びロイコマラカイトグリーン [C₂₃H₂₆N₂] 10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、それぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンとして 100 µg をそれぞれ含有する。）。
- 2) 安定同位体標識物質標準原液及び混合内標準液 安定同位体標識マラカイトグリーン^{注3} (MG-d₅) 5 mg 及び安定同位体標識ロイコマラカイトグリーン^{注3} (LMG-d₆) 5 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、それぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えて各安定同位体標識物質標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、MG-d₅ 及び LMG-d₆ として 100 µg をそれぞれ含有する。）。

更に、各標準原液の一部を混合し、アセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中に MG-d₅ 及び LMG-d₆ としてそれぞれ 25 ng を含有する混合内標準液を調製する。

- 3) 検量線作成用標準液 使用に際して、マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン各標準原液並びに混合内標準液の一部をアセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンとしてそれぞれ 0.5~200 ng を含有し、かつ MG-d₅ 及び LMG-d₆ としてそれぞれ 5 ng を含有する数点の検量線作成用標準液を調製する。
- 4) クエン酸-リン酸緩衝液 クエン酸-水和物 63.0 g (62.95~63.04 g) を水に溶かして 1,000 mL とし、リン酸水素二ナトリウム溶液 (0.6 mol/L) 300 mL 程度を加えて pH を 3.0 に調整する。

B 定 量

抽出 分析試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、クエン酸-リン酸緩衝液 10 mL 及びアセトニトリル 30 mL を加えた後 5 分間静置する。更にこの遠心沈殿管に混合内標準液 1 mL を加え、超高速破砕機で 1 分間かき混ぜて抽出する。

超高速破砕機を少量のアセトニトリルで洗浄し、洗液を抽出液に合わせた後、抽出液を 1,300×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を精製に供する試料溶液とする。

精製 試料溶液をあらかじめジクロロメタン 25 mL 及び塩化ナトリウム 5 g (4.5~5.4 g) を入れた 100 mL の分液漏斗に入れ、試料溶液の入っていた遠心沈殿管を少量のアセトニトリルで洗浄し、洗液を試料溶液に合わせる。分液漏斗を 1 分間振り混ぜた後静置し、アセトニトリル-ジクロロメタン層 (上層) をあらかじめ 20 g 以上の適量の硫酸ナトリウム (無水) ^{注4} をろ紙 (5 種 A) の上に積層させた漏斗で 200 mL のなす形フラスコにろ過する。先の分液漏斗及びろ紙を順次少量のジクロロメタンで洗浄し、洗液を同様にろ過してろ液を合わせる。

ろ液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した後、アセトニトリル-酢酸 (19+1) 5 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する。

カラム処理 ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) ^{注5} をアセトニトリル-酢酸 (19+1) 5 mL で洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコを少量のアセトニトリル-酢酸 (19+1) で洗浄し、洗液をミニカラムに加え、同様に流出させる。更にアセトン 2.5 mL、メタノール 5 mL 及びアセトニトリル 5 mL を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。

ミニカラムを 5 分間通気乾燥^{注6} した後、50 mL のなす型フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-アンモニア水 (19+1) 10 mL をミニカラムに加えてマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンを溶出させる。

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する。アセトニトリル-水 (1+1) 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルター (孔径 0.45 µm 以下) でろ過し、液体クロマトグラ

フタンドム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。
 液体クロマトグラフフタンドム型質量分析計による測定 試料溶液及び各混合標準液各 10 μ L を液体クロマトグラフフタンドム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μ m) ^{注7}
 溶離液 : 0.3 v/v% アンモニア水・2 v/v% ギ酸溶液-水-アセトニトリル^{注8} (10+81+9) - 0.3 v/v% アンモニア水・2 v/v% ギ酸溶液-水-アセトニトリル (10+9+81) (7+3) (1 min 保持) → 7 min → 0.3 v/v% アンモニア水・2 v/v% ギ酸溶液-水-アセトニトリル (10+9+81) (10 min 保持)

流速 : 0.25 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部 例1 ^{注9})

検出器 : 四重極型質量分析計

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード)

ネブライザーガス : N₂ (340 kPa)

乾燥ガス : N₂ (350 °C)

キャピラリー電圧 : 4 kV

フラグメンター電圧 : 下表のとおり

コリジョンエネルギー : 下表のとおり

モニターイオン : 下表のとおり

表 各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサー	プロダクトイオン		フラグメンター電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
	イオン (m/z)	定量用 (m/z)	確認用 (m/z)		
マラカイトグリーン	329	313	208	100	40
マラカイトグリーンd ₅	334	318	—	100	40
ロイコマラカイトグリーン	331	239	316	100	25
ロイコマラカイトグリーンd ₆	337	240	—	100	25

(タンデム型質量分析計部 例2 ^{注10})

検出器 : 四重極型質量分析計

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード)

イオン源温度 : 150 °C

デソルベーションガス : N₂ (400 °C)

キャピラリー電圧 : 3.5 kV

コーン電圧：下表のとおり

コリジョンエネルギー：下表のとおり

モニターイオン：下表のとおり

表 各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサー	プロダクトイオン		コーン	コリジョン
	イオン (<i>m/z</i>)	定量用 (<i>m/z</i>)	確認用 (<i>m/z</i>)	電圧 (V)	エネルギー (eV)
マラカイトグリーン	329	313	208	60	35
マラカイトグリーン _d ₅	334	318	—	60	35
ロイコマラカイトグリーン	331	239	316	50	30
ロイコマラカイトグリーン _d ₆	337	240	—	50	30

計算 得られた選択反応検出クロマトグラムからマラカイトグリーン、ロイコマラカイトグリーン、MG-_d₅ 及び LMG-_d₆ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のマラカイトグリーン量及びロイコマラカイトグリーン量を算出する。

注 1 マラカイトグリーン未変化体と代謝物との置換が起こり得ることから、試験操作を速やかに行うこと。

2 マラカイトグリーン [C₂₃H₂₅ClN₂] 10.0 mg は、マラカイトグリーンしゅう酸塩 [C₅₂H₅₄N₄O₁₂] 12.7 mg に相当する。

3 安定同位体標識として利用するマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンは、マラカイトグリーン _d₅ 及びロイコマラカイトグリーン _d₆ 又はこれらと同等のもの

4 PCB 試験用試薬又はこれと同等のもの

5 Bond Elut SCX (Agilent Technologies 製) に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

6 吸引マニホールドを用いて通気乾燥する。

7 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製) 又はこれと同等のもの

8 LC/MS 用 (関東化学製、富士フイルム和光純薬製) 又はこれと同等のもの

9 Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies 製) による条件例

10 Micromass Quattro micro API (Waters 製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

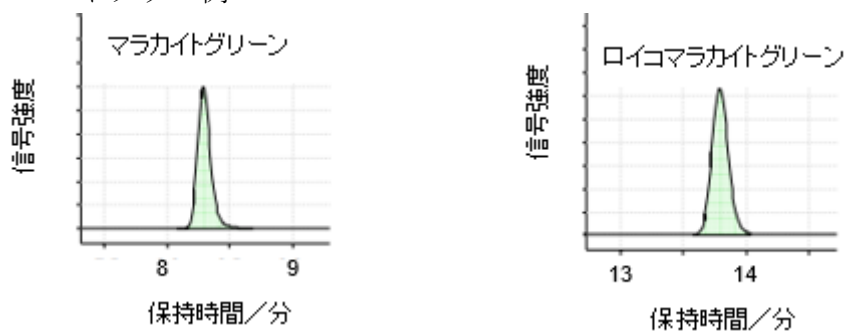
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
マラカイトグリーン	中すう育成用配合飼料	0.005	3	87.9	1.8
		0.1	3	84.2	0.7
	子豚育成用配合飼料	0.005	3	85.6	1.4
		0.1	3	90.5	1.6
	まだい育成用配合飼料	0.1	3	73.7	1.6
		魚粉	0.005	3	78.1
			0.1	3	81.4
	ロイコマラカイトグリーン	中すう育成用配合飼料	0.005	3	94.5
0.1			3	95.2	1.6
子豚育成用配合飼料		0.005	3	98.3	1.1
		0.1	3	99.0	3.1
まだい育成用配合飼料		0.1	3	93.9	1.9
		魚粉	0.005	3	85.0
			0.1	3	77.1

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
マラカイトグリーン	子豚育成用配合飼料	9	0	0.002	93.8	4.0	5.4	0.25
	養魚用配合飼料	3	0	0.005	101	1.7	2.7	0.12
	養魚用配合飼料	3	0	0.01	94.3	11	12	0.56
	魚粉	9	0	0.002	86.1	3.9	7.4	0.34
ロイコマラカイトグリーン	子豚育成用配合飼料	9	0	0.002	100	3.9	6.1	0.28
	養魚用配合飼料	3	0	0.005	102	1.0	7.8	0.35
	養魚用配合飼料	3	0	0.01	101	1.7	8.2	0.37
	魚粉	9	0	0.002	91.3	4.6	16	0.74

・検出下限 (単一試験室による確認) 試料中 0.002 g/t

(参考) クロマトグラム例



添加試料 (魚粉にマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンとして 0.005 g/t 相当量添加) のクロマトグラム

4 マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法 (その2 魚油)

- (1) 分析対象化合物 マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン (2成分)
- (2) 適用範囲 魚油

(3) 分析法^{注1}

A 試薬の調製

- 1) マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン標準原液^{注2} 2の(3)のAの1)による。
- 2) 安定同位体標識物質標準原液及び混合内標準液 2の(3)のAの2)により、1 mL 中に安定同位体標識マラカイトグリーン^{注3} (MG-d₅) 及び安定同位体標識ロイコマラカイトグリーン^{注3} (LMG-d₆) として 100 µg をそれぞれ含有する各安定同位体標識物質標準原液を調製する。
更に、各標準原液の一部を混合し、アセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に MG-d₅ 及び LMG-d₆ としてそれぞれ 1 µg を含有する混合内標準液を調製する。
- 3) 検量線作成用標準液 使用に際して、マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーン各標準原液並びに混合内標準液の一部をアセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンとしてそれぞれ 0.5~20 ng を含有し、かつ MG-d₅ 及び LMG-d₆ としてそれぞれ 5 ng を含有する数点の検量線作成用標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、混合内標準液 50 µL を正確に加える。アセトニトリル-酢酸 (19+1) 40 mL 及びアセトニトリル飽和ヘキサン 10 mL を加え、10 分間振り混ぜて抽出する。1,300×g で 5 分間遠心分離し、ヘキサン層 (上層) を捨て、アセトニトリル層 (下層) を試料溶液とする。

カラム処理 ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) ^{注4} をアセトニトリル-酢酸 (19+1) 5 mL で洗浄する。試料溶液 4 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る。アセトン 2.5 mL 及びアセトニトリル 5 mL を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-アンモニア水 (19+1) 10 mL をミニカラムに加えてマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンを溶出させる。

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

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 2の(3)のBの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定の項による。

計 算 2の(3)のBの計算の項による。

注 1 マラカイトグリーン未変化体と代謝物との置換が起こり得ることから、試験操作を速やかに行うこと。

2 マラカイトグリーン [C₂₃H₂₅ClN₂] 10.0 mg は、マラカイトグリーンしゅう酸塩 [C₅₂H₅₄N₄O₁₂] 12.7 mg に相当する。

3 安定同位体標識として利用するマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンは、マラカイトグリーン d₅ 及びロイコマラカイトグリーン d₆ 又はこれらと同等のもの

4 Bond Elut SCX (Agilent Technologies 製) に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

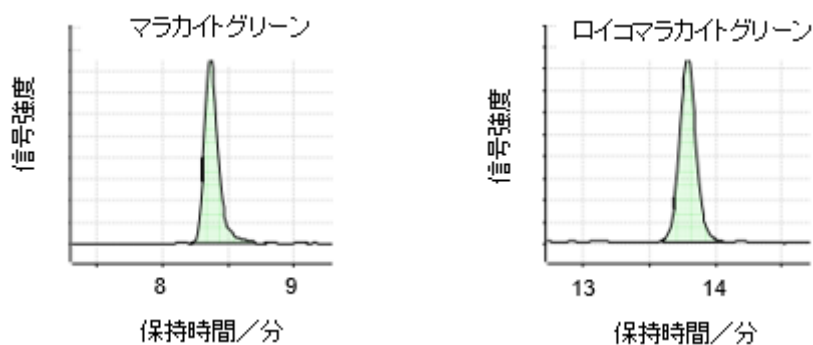
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
マラカイトグリーン	精製魚油1	0.002	3	97.4	5.9
		0.1	3	93.9	1.8
	精製魚油2	0.002	3	98.0	3.3
		0.1	3	89.9	3.1
	未精製魚油1	0.002	3	98.1	10
		0.1	3	91.8	2.1
未精製魚油2	0.002	3	101	4.6	
	0.1	3	94.2	2.5	
ロイコマラカイトグリーン	精製魚油1	0.002	3	107	3.0
		0.1	3	99.5	0.5
	精製魚油2	0.002	3	112	3.1
		0.1	3	103	3.9
	未精製魚油1	0.002	3	97.7	1.6
		0.1	3	94.6	1.7
	未精製魚油2	0.002	3	105	1.1
		0.1	3	99.4	1.6

・ 共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/t)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
マラカイトグリーン	精製魚油	8	0	0.005	87.4	6.8	13	0.60
	未精製魚油	8	0	0.005	85.9	2.5	12	0.56
ロイコマラカイトグリーン	精製魚油	8	0	0.005	108	3.8	8.2	0.37
	未精製魚油	8	0	0.005	101	4.2	6.2	0.28

・ 検出下限 (単一試験室による確認) 試料中 0.002 g/t

(参考) クロマトグラム例



添加試料 (魚油にマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンとして 0.002 g/t 相当量添加) のクロマトグラム