

第9章 抗生物質

第1節 微生物学的試験法通則

水、試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものを用いる。

1 平板法

A 試薬等の調製

1) 緩衝液

緩衝液は、次に掲げる方法により調製し、121 °C で15分間高圧蒸気滅菌する。
なお、pH の調整を要する場合には、リン酸 (1 mol/L) 又は水酸化カリウム溶液 (1 mol/L) を用いて行う。

i) 1号緩衝液 (pH 4.5)

リン酸二水素カリウム 13.6 g を量って水 750 mL に溶かし、pH を 4.4~4.6 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

ii) 2号緩衝液 (pH 6.0)

リン酸二水素カリウム 3.5 g

リン酸水素二ナトリウム・12水 3 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、pH を 5.9~6.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

iii) 3号緩衝液 (pH 6.0)

リン酸二水素カリウム 7 g

リン酸水素二ナトリウム・12水 6 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、pH を 5.9~6.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

iv) 4号緩衝液 (pH 8.0)

リン酸二水素カリウム 13.3 g を量って水 750 mL に溶かし、水酸化カリウム溶液 (1 mol/L) 100 mL 程度を加えて pH を 7.9~8.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

v) 5号緩衝液 (pH 6.0)

リン酸二水素カリウム 80 g

リン酸水素二カリウム 20 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、pH を 5.9~6.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

vi) 6号緩衝液 (pH 8.0)

リン酸二水素カリウム 13.3 g

塩化ナトリウム 100 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、水酸化カリウム溶液 (1 mol/L) 100 mL 程度を加えて pH を 7.9~8.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

vii) 7号緩衝液 (pH 7.0)

リン酸二水素カリウム 6.4 g

リン酸水素二ナトリウム・12水 18.9 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、pH を 6.9~7.1 に調整した後、更に水を

加えて 1,000 mL とする。

viii) 8号緩衝液 (pH 4.0)

乳酸 7.5 mL を量って水 750 mL に溶かし、水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) 50 mL 程度を加えて pH を 3.9~4.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

ix) 9号緩衝液 (pH 8.0)

リン酸二水素カリウム 0.5 g
リン酸水素二カリウム 16.7 g
炭酸水素ナトリウム 20 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、pH を 7.9~8.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

x) 10号緩衝液 (pH 9.2)

リン酸 2.3 mL
酢酸 2.3 mL
ホウ酸 2.5 g

上記分量を量って水 1,000 mL に溶かし、水酸化ナトリウム溶液 (0.2 mol/L) 700 mL 程度を加えて pH を 9.1~9.3 に調整する。

xi) 11号緩衝液 (pH 4.0)

1,2-ジヒドロキシベンゼン-3,5-ジスルホン酸ナトリウム 15.7 g を量って水 750 mL に溶かし、乳酸 7.5 mL 及び水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) 50 mL 程度を加えて pH を 3.9~4.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

xii) 12号緩衝液 (pH 7.5)

リン酸二水素カリウム 3.5 g
リン酸水素二ナトリウム・12水 3 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、pH を 7.4~7.6 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

2) 標準液

標準液は、第2節各条に規定するところにより調製する。

この場合、標準原液は、常用標準品（飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和51年農林省令第35号）別表第2の6の(13)に規定する常用標準品又は従前に規定されていた常用標準品）を用いて相対湿度 50 % 以下の大気中で調製し、密封して -20 °C 以下で保存する。

3) 培地

培地は、次の表に掲げる組成及び pH を有するものを調製し、121 °C で 15 分間 高圧蒸気滅菌する。なお、pH の調整を要する場合は、塩酸 (1 mol/L) 又は水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) を用いる。

培地 1,000 mL あたりの組成及び pH

培地番号	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6	F-7	F-8	F-9	F-10
ペプトン (g)	10	10	5	6	10	7.2	6	7.2		10
胨消化カゼイン (g)									17	
パパイン消化大豆 (g)									3	
パパイン消化肝臓 (g)										
肉エキス (g)	5	5	3	1.5	2	1.8	1.5	1.8		10
牛心臓浸出液 (g)					250					
子牛脳浸出液 (g)					200					
酵母エキス (g)				3		3.6	3	3.6		
ブドウ糖 (g)				1	2	7.2	1	7.2	2.5	
塩化ナトリウム (g)	2.5	2.5			5	17.4		7.2	5	5
塩化マグネシウム (g)										
硫酸マグネシウム七水和物 (g)										
リン酸水素二カリウム (g)									2.5	
リン酸水素二ナトリウム・12水 (g)					2.5					
リン酸二水素カリウム (g)										
ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイン酸エステル (mL)									10	
ポリグリコールエーテル界面活性剤 ^{注1} 溶液 (1w/v%) (mL)										
カンテン ^{注2} (g)	13~20		13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20
水	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量
滅菌後の pH	6.4~6.6	6.9~7.1	7.9~8.1	6.4~6.6	7.9~8.1	5.9~6.1	7.9~8.1	7.9~8.1	7.2~7.4	6.4~6.6

注 1 Tergitol Type NP-10 (Sigma Aldrich 製) 又はこれと同等のもの

2 Bacto-Agar (Difco 製) 又はこれと同等のもの

培 地 番 号	F-11	F-12	F-13	F-14	F-15	F-16	F-17	F-18	F-19	F-20
ペプトン (g)		3.75	5	5		2	6			
胨消化カゼイン (g)										
パパイン消化大豆 (g)										3
パパイン消化肝臓 (g)		0.63								
肉エキス (g)			5	3			1.5			
牛心臓浸出液 (g)										
子牛脳浸出液 (g)										
酵母エキス (g)	1	1.25			2.5	2.5	3	2.5	2.5	
ブドウ糖 (g)	10				10	1		10	10	
塩化ナトリウム (g)		1.25	80		70					
塩化マグネシウム (g)								10	10	
硫酸マグネシウム七水和物 (g)					50					
リン酸水素二カリウム (g)										
リン酸水素二ナトリウム・12水 (g)			2							
リン酸二水素カリウム (g)										
ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイン酸エステル (mL)										
ポリグリコールエーテル界面活性剤 ^{注1} 溶液 (1w/v%) (mL)	3									
カンテン ^{注2} (g)	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20
水	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量
滅菌後の pH	5.9~6.1	7.2~7.4	7.9~8.1	5.9~6.1	4.9~5.1	5.9~6.1	5.6~5.8	無調整	6.9~7.1	5.9~6.1

培 地 番 号	F-21	F-22	F-23	F-24	F-25	F-111 ^{注3}	F-112 ^{注4}	F-201 ^{注5}	F-202 ^{注6}
ペプトン (g)	5		5	10	7.2	6	7.2	10	10
胨消化カゼイン (g)						4			
パパイン消化大豆 (g)									
パパイン消化肝臓 (g)									
肉エキス (g)	5		1.5	5	1.8	1.5	1.8		
牛心臓浸出液 (g)								500	250
子牛脳浸出液 (g)									200
酵母エキス (g)		2.5	1.5		3.6	3	3.6		
ブドウ糖 (g)		10	1		7.2	1	7.2		2
塩化ナトリウム (g)	50		3.5	2.5	37.2		7.2	5	5
塩化マグネシウム (g)									
硫酸マグネシウム七水和物 (g)		50							
リン酸水素二カリウム (g)			3.68						
リン酸水素二ナトリウム・12水 (g)	0.5								2.5
リン酸二水素カリウム (g)			1.32						
ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイン酸エステル (mL)									
ポリグリコールエーテル界面活性剤 ^{注1} 溶液 (1w/v%) (mL)									
カンテン ^{注2} (g)	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	
水	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量
滅菌後の pH	5.9~6.1	5.9~6.1	6.9~7.1	7.9~8.1	7.9~8.1	7.9~8.1	5.9~6.1	7.3~7.5	7.3~7.5

注 3 Antibiotic Medium 11 (Difco 製) 又はこれと同等のもの

4 Antibiotic Medium 12 (Difco 製) 又はこれと同等のもの

5 Bacto-Heart Infusion Agar (Difco 製) 又はこれと同等のもの

6 Brain Heart Infusion Broth (Difco 製) 又はこれと同等のもの

4) 菌液又は孢子液及び添加量

試験菌の菌液又は孢子液は、次に掲げる方法により調製する。添加量は、第2節各条に規定する量を目安とし、2-2 用量法により定量する場合には、高濃度標準液による阻止円直径が 20~25 mm に、かつ、低濃度標準液による阻止円直径が 15~20 mm になるように、また、標準曲線法により定量する場合には、参照標準液による阻止円直径が 20 mm 前後になるように菌液又は孢子液を第2節各条に規定する培地に加える。なお、菌液を希釈する場合には、F-2 号培地又は F-202 号培地を用い、孢子液を希釈する場合には、水又は生理食塩液を用いる。

i) *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617、*Escherichia coli* ATCC 27166、*Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び *Micrococcus luteus* ATCC 10240 の菌液

試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 35~37 °C で 16~24 時間、少なくとも 3 回継代培養する。この菌 1 白金耳を F-2 号培地又は F-202 号培地 20 mL に移植し、35~37 °C で 16~24 時間振とう培養して菌液とする。

ii) *Brevibacterium citreum* var. *polynactinus* の菌液

試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 29~31 °C で 16~24 時間、少なくとも 3 回継代培養する。この菌 1 白金耳を F-2 号培地又は F-202 号培地 20 mL に移植し、29~31 °C で 16~24 時間振とう培養して菌液とする。

iii) *Corynebacterium xerosis* NCTC 9755 の菌液

試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 35~37 °C で 16~24 時間、少なくとも 3 回継代培養する。この菌 1 白金耳を F-2 号培地又は F-202 号培地 10 mL に移植し、35~37 °C で 4 時間振とう培養して菌液とする。

iv) *Escherichia coli* BS-10 の菌液

試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 29~31 °C で 16~24 時間、少なくとも 3 回継代培養する。この菌 1 白金耳を F-202 号培地 10 mL に移植し、29~31 °C で 16~24 時間振とう培養する。

更に、培養液 1 mL を F-202 号培地 10 mL に移植し、29~31 °C で 3 時間振とう培養して菌液とする。

v) *Bacillus cereus* ATCC 11778、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 及び *Bacillus subtilis* ATCC 11774 の孢子液

試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 35~37 °C で 16~24 時間、3 か月間隔で継代培養する。この菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に接種し、35~37 °C で 1 週間以上培養して孢子を作らせる。孢子をかき取って水又は生理食塩液に均等に浮遊させ、1,500×g で 10 分間遠心分離して上澄み液を捨てた後、水又は生理食塩液を加えて振とうし、65 °C で 30 分間ずつ、24 時間間隔で 2 回加熱する。さらに、1,500×g で 10 分間遠心分離して上澄み液を捨てた後、水又は生理食塩液を加え、孢子を浮遊させて孢子液とする。

vi) *Bacillus cereus* ATCC 19637 の孢子液

試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 27~29 °C で 16~24 時間、3 か月間隔で継代培養する。この菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に接種し、27~29 °C で 1 週間以上培養して孢子を作らせる。孢子をかき取って水又は生理食塩液に均等に浮

遊させ、1,500×g で 10 分間遠心分離して上澄み液を捨てた後、水又は生理食塩液を加えて振とうし、65 °C で 30 分間ずつ、24 時間間隔で 2 回加熱する。更に、1,500×g で 10 分間遠心分離して上澄み液を捨てた後、水又は生理食塩液を加え、胞子を浮遊させて胞子液とする。

5) 寒天平板

寒天平板は、第 2 節各条に別段の規定のある場合を除き、次に掲げる方法により調製し、その日のうちに使用する。

i) 円筒法

4)により調製した菌液又は胞子液を一度融かして 49~51 °C に保温した第 2 節各条に規定する培地に加えて十分にかき混ぜ、10 mL をペトリ皿（内径 90 mm、高さ 20 mm の合成樹脂製又は硬質ガラス製のもの）に一様に広がるように分注した後、水平に静置して凝固させる。平板上の半径 25 mm の円周上の相隣する各々が中心に対して 90°の間隔になるような位置に 4 個の円筒（外径 7.9~8.1 mm、内径 5.9~6.1 mm、高さ 9.9~10.1 mm のステンレス鋼製のもの）を 10~13 mm の高さから垂直に落して置く。

ii) せん孔法

4)により調製した菌液又は胞子液を一度融かして 49~51 °C に保温した第 2 節各条に規定する培地に加えて十分にかき混ぜ、20 mL をペトリ皿（内径 90 mm、高さ 20 mm の合成樹脂製又は硬質ガラス製のもの）に一様に広がるように分注した後、水平に静置して凝固させる。平板上の半径 25 mm の円周上の相隣する各々が中心に対して 90°の間隔になるような位置に径 7.9~8.1 mm の 4 個の正円のせん孔を設ける。

B 試料溶液の調製

試料溶液は、第 2 節各条に規定するところにより速やかに調製する。

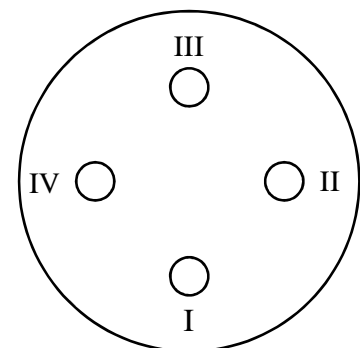
なお、第 2 節各条に規定する試料溶液の濃度は、表示量より算出されるものである。

C 定 量

定量は、第 2 節各条に別段の規定のある場合を除き、次に掲げる方法により行う。

1) 2-2 用量法

分 注 寒天平板 5 枚をとり、図のように、各寒天平板の第 I の円筒又はせん孔には高濃度標準液 (S_H)、第 II の円筒又はせん孔には高濃度試料溶液 (U_H)、第 III の円筒又はせん孔には低濃度標準液 (S_L)、第 IV の円筒又はせん孔には低濃度試料溶液 (U_L) をそれぞれ円筒法による場合には 0.25 mL、せん孔法による場合には 0.1 mL ずつ分注する。



培 養 各寒天平板は、10~20 °C で 2 時間静置した後、ふ卵器に収め、35~37 °C で 16~24 時間培養する。

阻止円直径の測定 培養を終えた寒天平板をふ卵器から取り出し、阻止円直径をそれぞれ 0.25 mm 以下まで正確に測定し、結果を次の様式の表に記入する。

(単位：mm)

番号	I	III	II	IV
内容 寒天平板	高濃度標準液 (S _H)	低濃度標準液 (S _L)	高濃度試料溶液 (U _H)	低濃度試料溶液 (U _L)
1				
2				
3				
4				
5				
計	Σ S _H	Σ S _L	Σ U _H	Σ U _L

計算 標準液の濃度 (μg(力価)又は単位/mL) に対する試料溶液中の抗生物質の濃度 (μg(力価)又は単位/mL) の比 (θ) を(1)式により求めた後、試料中の抗生物質の濃度 (g(力価)又は単位/kg (g(力価)又は単位/トン)) を(2)式により求める。

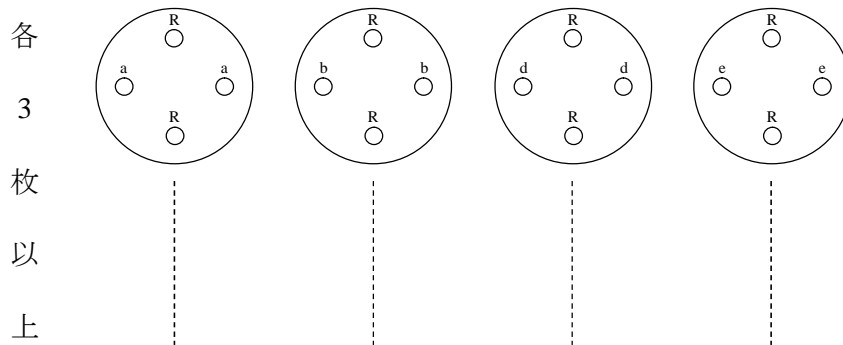
$$\log \theta = \frac{(\sum U_H + \sum U_L) - (\sum S_H + \sum S_L)}{(\sum U_H + \sum S_H) - (\sum U_L + \sum S_L)} \times \log X \dots (1)$$

X : 低濃度標準液の濃度に対する高濃度標準液の濃度の比

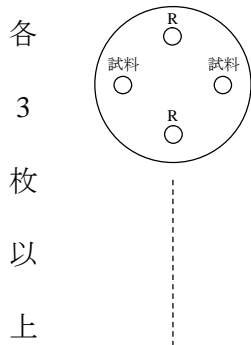
試料中の抗生物質の濃度 = θ × 試料中の抗生物質の推定濃度 … (2)

2) 標準曲線法

標準液の分注 各標準液について寒天平板 3 枚以上をとり、標準液の濃度を高濃度から順に a、b、c、d、e とした場合、c を参照標準液 (RP) とし、図のように、各標準液を円筒法による場合には 0.25 mL、せん孔法による場合には 0.1 mL ずつ分注する。



試料溶液の分注 寒天平板 3 枚以上をとり、図のように、試料溶液及び参照標準液を円筒法の場合には 0.25 mL、せん孔法の場合には 0.1 mL ずつ分注する。



培 養 各寒天平板は、10~20 °C で 2 時間静置した後、ふ卵器に収め、35~37 °C で 16~24 時間培養する。

阻止円直径の測定 培養を終えた寒天平板をふ卵器から取り出し、阻止円直径をそれぞれ 0.25 mm 以下まで正確に測定し、結果を次の様式の表に記入する。

(単位：mm)

寒天平板 \ 内容	RP	a	RP	b	RP	d	RP	e	RP	試料
1										
1'										
2										
2'										
3										
3'										
⋮										
⋮										
阻止円直径の の平均値										
阻止円直径 の修正値										

計 算 参照標準液及び標準液を分注した 4 組の寒天平板について、各組ごとの参照標準液の阻止円直径の平均値及び標準液の阻止円直径の平均値並びに 4 組すべての参照標準液の阻止円直径の平均値 (C: 補正用平均値) を求める。

各組の参照標準液の阻止円直径の平均値が補正用平均値と相違する場合には、この差をその組の標準液の阻止円直径の平均値に加減して各標準液の阻止円直径の修正値を求める。

例えば、ある組の標準液の阻止円直径の平均値が 18.0 mm であって、その組の参照標準液の阻止円直径の平均値が 19.8 mm であり、補正用平均値が 20.0 mm であるとき、これを $18.0 + (20.0 - 19.8)$ mm と修正する。

次に、片対数方眼紙を用い、各標準液の濃度 (µg(力価)又は単位/mL) の対数を横軸に各標準液の阻止円直径の修正値を縦軸にとり、補正用平均値及び各標準

液の阻止円直径の修正値を記入し、これらの点の最も近くを通る直線を引き、標準曲線とする。

なお、補正用平均値及び各標準液の阻止円直径の修正値がほぼ直線上にある場合には、次式により得られる H 点及び L 点を片対数方眼紙上に印し、これを直線で結ぶことができる。

$$H = \frac{3A + 2B + C - E}{5} \qquad L = \frac{3E + 2D + C - A}{5}$$

H : 標準液 a に対応する阻止円直径の計算値

L : 標準液 e に対応する阻止円直径の計算値

A, B, D, E : 各標準液 (a, b, d, e) の阻止円直径の修正値

更に、参照標準液及び試料溶液を分注した寒天平板について、参照標準液の阻止円直径の平均値及び試料溶液の阻止円直径の平均値を求める。

参照標準液の阻止円直径の平均値が標準曲線上の参照標準液の阻止円直径の修正値と相違する場合には、この差を試料溶液の阻止円直径の平均値に加減して試料溶液の阻止円直径の修正値を求める。

次に、この修正値に対する標準曲線上の点から試料溶液中の抗生物質の濃度 (μg (力価)又は単位/mL) (n) を求め、参照標準液の濃度 (μg (力価)又は単位/mL) に対する n の比 (θ) を求めた後、試料中の抗生物質の濃度 (g (力価)又は単位/kg (g (力価)又は単位/トン)) を次式により求める。

試料中の抗生物質の濃度 = $\theta \times$ 試料中の抗生物質の推定濃度

2 バイオオートグラフ法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 1 の A の 1)による。
- 2) 標準液 1 の A の 2)による。
- 3) 培地 1 の A の 3)による。
- 4) 菌液又は孢子液及び添加量 1 の A の 4)による。

B 試料溶液の調製

試料溶液は、第 2 節各条に規定するところにより速やかに調製する。

C 定 量

定量は、第 2 節各条に別段の規定のある場合を除き、次に掲げる方法により行う。

薄層クロマトグラフィー 薄層板の下端から 20 mm の位置を原線とし、左右両端から 25 mm 離し、標準液及び試料溶液各 20 μL ずつをマイクロシリンジでそれぞれ正確に原線上に 30 mm 間隔でスポットし、風乾する。

薄層板をあらかじめ展開溶媒の気体で 1 時間以上飽和した展開槽に入れ、20~25 $^{\circ}\text{C}$ で展開溶媒を上昇させる。展開溶媒の上達線が、第 2 節各条に規定する位置に達したとき、展開をやめ、薄層板を取り出し、室温で静置して展開溶媒を乾燥除去する。

寒天平板の調製 薄層板をそのガラス面を下にして培養箱 (縦 210 mm、横 210 mm、高さ約 15 mm のステンレス鋼製又は合成樹脂製のもの) に入れ、一度融かし

て 49~51 °C に保温した第 2 節各条に規定する培地を薄層板全面に均一にスプレーする。数分間静置した後、A の 4)により調製した菌液又は孢子液を培地 100 mL に加えて十分にかき混ぜ、一様に広がるように流し込み、水平に静置して固化させる。

培 養 培養箱は、10~20 °C で 3 時間静置した後、ふ卵器に収め、35~37 °C で 16~24 時間培養する。

同 定 培養を終えた培養箱をふ卵器から取り出し、第 2 節各条に規定する発色試薬を培地表面全面に注いで発色させ、標準液及び試料溶液の阻止円の Rf 値^{注 1}を測定し、同定する。

阻止円直径の測定 阻止円の長径 (a mm) 及び短径 (b mm) を 0.25 mm 以下まで正確に測定し、幾何学的平均値 (\sqrt{ab} mm) をもって阻止円直径とする。

計 算 標準液より得られた阻止円直径を方眼紙に目盛り、検量線を作成し、検量線から試料溶液の阻止円直径に相当する試料中の濃度を算出する。

注 1 Rf 値 = $\frac{\text{原線から阻止円中心までの距離}}{\text{原線から展開溶媒上達線までの距離}}$

(付 記)

以下、抗生物質の名称を次の略号で表わす場合がある。

亜鉛バシトラシン	: BC
アビラマイシン	: AVM
アボパルシン	: AV
アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン	: OTC
エフロトマイシン	: ET
塩酸オキシテトラサイクリン	: OTC
エンボン酸スピラマイシン	: SP
エンラマイシン	: ER
オリエンチシン	: OR
キタサマイシン	: KT
クロラムフェニコール	: CP
クロルテトラサイクリン	: CTC
ケベマイシンナトリウム	: QM
サリノマイシンナトリウム	: SL
セデカマイシン	: SCM
センデュラマイシンナトリウム	: SD
チオペプチン	: TP
DESTマイシン A	: DM-A
ナラシン	: NR
ノシヘプタイド	: NH
ハイグロマイシン B	: HM-B
バージニアマイシン	: VM
ビコザマイシン	: BZM
フラボフォスフォリポール	: FV
ポリスチレンスルホン酸オレアンドマイシン	: OM
ポリナクチン	: PN
マカルボマイシン	: MC
マンガンバシトラシン	: BC
モネンシンナトリウム	: MN
ラサロシドナトリウム	: LS
硫酸カナマイシン	: KM
硫酸コリスチン	: CL
硫酸フラジオマイシン	: FM
リン酸タイロシン	: TS

第2節 各条

1 亜鉛バシトラシン又はマンガンバシトラシン

1.1 定量試験法（プレミックス）

1.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 3号緩衝液
- 2) バシトラシン標準液 常用標準バシトラシン適量を減圧下（0.67 kPa以下）、60℃で3時間乾燥した後、40 mg以上を正確に量り、3号緩衝液を正確に加えて溶かし、100単位/mLのバシトラシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を3号緩衝液で正確に希釈し、0.2単位/mLの高濃度標準液及び0.05単位/mLの低濃度標準液を調製する。
- 3) 培地 F-1号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用い、10倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 水ーピリジンー塩酸（1 mol/L）（62+18+9）

B 試料溶液の調製

- 1) 分析試料に SL 又は MN を含まない場合
分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5種 A）でろ過する。
ろ液の一定量を 3号緩衝液で正確に希釈し、0.2 単位/mL の高濃度試料溶液及び 0.05 単位/mL の低濃度試料溶液を調製する。
- 2) 分析試料に SL 又は MN を含む場合
分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5種 A）でろ過する。
ろ液 25 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、塩酸で pH を 1.0 以下に調整した後 1 時間静置し、更にアンモニア水で pH を 5.9~6.1 に調整する。この液全量を 3号緩衝液で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 3号緩衝液を加えた後、ろ紙（5種 A）でろ過する。
ろ液の一定量を 3号緩衝液で正確に希釈し、0.2 単位/mL の高濃度試料溶液及び 0.05 単位/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (万単位/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以内)
亜鉛バシトラシン	ビタミンプレミックス	24~168	3	99.6~100.8	2.8
	ビタミン・ミネラル プレミックス	24~168	3	99.3~100.6	3.4

1.2 定量試験法 (飼料)

1.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 3号緩衝液
- 2) バシトラシン標準液 1.1.1のAの2)により100単位/mLのバシトラシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を3号緩衝液-メタノール(3+1)で正確に希釈し、0.4単位/mL、0.2単位/mL、0.1単位/mL、0.05単位/mL及び0.025単位/mLの各標準液を調製する。
- 3) 培地 F-1号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用い、10倍希釈した菌液を培地100 mLに対して0.1 mL程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 メタノール-塩酸(0.3 mol/L) (1+1)

B 試料溶液の調製

分析試料の一定量(BCとして20単位相当量)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、20分間かき混ぜて抽出する。抽出液を50 mLの共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×gで5分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙(5種A)でろ過する。

ろ液25 mLを50 mLのビーカーに正確に入れ、アンモニア水(6 mol/L)でpHを5.9~6.1に調整する。この液全量を3号緩衝液で50 mLの全量フラスコに移し、更に標線まで3号緩衝液を加えた後、ろ紙(5種A)でろ過し、0.1単位/mLの試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (万単位/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
亜鉛バシトラシン	幼すう用配合飼料	84~420	6	96.0~99.6	6.1
	ほ乳期子豚用配合飼料	84~420	6	96.6~98.0	5.9
	ほ乳期子牛用配合飼料	84~420	6	94.6~96.2	5.0

2 アビラマイシン

2.1 定量試験法（プレミックス）

2.1.1 平板法（その1）

（適用範囲：SL、MN 又は LS を含まないプレミックス）

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 7号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 7号緩衝液－アセトン（4+1）
- 3) アビラマイシン標準液 常用標準アビラマイシン適量を減圧下（2.67~3.33 kPa 以下）、60 °C で3時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、アセトンを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のアビラマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 4) 培地 F-8号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用い、菌液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

分析試料^{注1} 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、7号緩衝液 20 mL を加え、5分間かき混ぜる。更にアセトン 80 mL を加え、20分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5種 A）でろ過する。

ろ液の一定量を試料溶液のアセトン濃度が 20 v/v% となるように 7号緩衝液又は希釈溶媒で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

注 1 分析試料は、0.5 mm の網ふるいを通過するように粉砕する。

（付記）抽出液の pH が 4.5 以下となるプレミックスは、次の方法により、抽出液を調製する。

分析試料 3~5 g を正確に量って 50mL のビーカーに入れ、7号緩衝液 20 mL を加え、5分間かき混ぜる。更に、この液の pH が 4.5~5.0 となるまで水酸化ナトリウム溶液（10 mol/L）を加え、その必要量を確認する。

別に、分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、7号緩衝液 20 mL を加え、更に、先に確認した必要量の水酸化ナトリウム溶液（10 mol/L）を加えて5分間かき混ぜる。次に、先に加えた水酸化ナトリウム溶液（10 mol/L）の量を 80 mL から差し引いた量のアセトンを加え、20分間かき混ぜて抽出液とする。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
鶏用プレミックス	0.2~5	3	95.3~99.7	9.9
鶏用プレミックス	0.2~5	3	99.7~105.0	12.1
豚用プレミックス	0.2~5	3	94.7~103.3	8.0

・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
鶏用プレミックス	8	1	102.4	3.4	6.6

2.1.2 平板法 (その2)

(適用範囲: SL 又は LS を含むプレミックス)

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 7号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 7号緩衝液-アセトン (4+1)
- 3) アビラマイシン標準液 2.1.1 の A の 3)により 1 mg(力価)/mL のアビラマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、0.4 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.1 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 4) 培地 F-25 号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用い、菌液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料^{註1} 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、7号緩衝液 20 mL を加え、5分間かき混ぜる。更にアセトン 80 mL を加え、20分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5種 A) でろ過する。ろ液の一定量をアセトン濃度が 45 v/v% になるように 7号緩衝液で希釈した後、ろ紙 (5種 A) でろ過して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) をアセトン 10 mL 及び 7号緩衝液-アセトン (11+9) 10 mL で順次洗浄する。

50 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液 10 mL をミニカラムに正確に入れ、圧注^{註2}して AVM を流出させる。7号緩衝液-アセトン (11+9) 5 mL をミニカラムに加えて圧注^{註2}し同様に流出させ、同様に 2回操作する。全量フラスコの標線まで 7号緩衝液-アセトン (11+9) を加え、この液の一定量をアセトン濃度が 20 v/v% となるように 7号緩衝液で希釈し、更に 7号緩衝液-アセトン (4+1) で希釈し、0.4 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.1 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

注 1 分析試料は、0.5 mm の網ふるいを通過するように粉碎する。

2 流速は、2~3 mL/min とする。

(付記) 抽出液の pH が 4.5 以下となるプレミックスは、次の方法により、抽出液を調製する。

分析試料 3~5 g を正確に量って 50mL のビーカーに入れ、7 号緩衝液 20 mL を加え、5 分間かき混ぜる。更に、この液の pH が 4.5~5.0 となるまで水酸化ナトリウム溶液 (10 mol/L) を加え、その必要量を確認する。

別に、分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、7 号緩衝液 20 mL を加え、更に、先に確認した必要量の水酸化ナトリウム溶液 (10 mol/L) を加えて 5 分間かき混ぜる。次に、先に加えた水酸化ナトリウム溶液 (10 mol/L) の量を 80 mL から差し引いた量のアセトンを加え、20 分間かき混ぜて抽出液とする。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
鶏用プレミックス(2種) (SL含有量は、AVMの20倍)	0.2~1	3	100.3~109.7	10.6
鶏用プレミックス(2種) (LS含有量は、AVMの30倍)	0.2~1	3	90.3~105.0	7.6

・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
鶏用プレミックス	8	1	100.5	2.3	5.1

2.2 定量試験法 (飼料)

2.2.1 平板法 (その 1)

(適用範囲: 豚用飼料)

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 7 号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 7 号緩衝液-アセトン (4+1)
- 3) アピラマイシン標準液 2.1.1 の A の 3)により 1 mg(力価)/mL のアピラマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、0.8 μg(力価)/mL、0.4 μg(力価)/mL、0.2 μg(力価)/mL、0.1 μg(力価)/mL 及び 0.05 μg(力価)/mL の各標準液を調製する。

- 4) 培地 F-25 号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。

- 6) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

分析試料^{注1} 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトン-水 (4+1) 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、ろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液の一定量を試料溶液のアセトン濃度が 20 v/v% となるように希釈溶媒及び 7 号緩衝液-アセトン (19+1) で正確に希釈し、0.2 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

注 1 分析試料は、0.5 mm の網ふるいを通過するように粉砕する。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
豚用配合飼料 (3種)	10~40	各3	94.1~112.7	7.8

- ・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
子豚育成用配合飼料	8	20	101.3	4.0	5.5

2.2.2 平板法 (その 2)

(適用範囲: SL 又は LS を含まない飼料)

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 7 号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 7 号緩衝液-アセトン (4+1)
- 3) アビラマイシン標準液 2.1.1 の A の 3) により 1 mg(力価)/mL のアビラマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL、1 µg(力価)/mL、0.5 µg(力価)/mL、0.25 µg(力価)/mL 及び 0.125 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。
- 4) 培 地 F-8 号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.4 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

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、クロロホルム 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過し、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) をクロロホルム 10 mL で洗浄

する。

試料溶液 2.5~10 mL (AVM として 2.5~10 µg(力価)相当量) をミニカラムに正確に入れ、そのミニカラムのリザーバー内の残量が 1 mL に達するまで自然流下させた後、クロロホルム-アセトン (17+3) 30 mL をミニカラムに加え、ミニカラムを洗浄する。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトン 20 mL をミニカラムに加えて AVM を溶出させる。

溶出液を 50 °C の水浴で減圧乾固した後、希釈溶媒 5~20 mL を正確に加えて残留物を溶かし、0.5 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	2.5~40	3	98.3~106.5	6.5
プロイラー後期用配合飼料	2.5~40	3	102.1~107.2	6.9
ほ乳期子豚用配合飼料	2.5~40	3	93.7~107.0	9.0

- ・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
プロイラー 前期用配合飼料	11	13	100.8	4.5	3.7

3 アボパルシン

3.1 定量試験法 (プレミックス)

3.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 1号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 1号緩衝液-アセトン (7+3) の pH を塩酸 (6 mol/L) で 4.4~4.6 に調整し、希釈溶媒とする。
- 3) アボパルシン標準液 常用標準アボパルシン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、1号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のアボパルシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

- 4) 培 地 F-20 号培地
- 5) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 11774 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を調製し、培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。
ただし、孢子液を添加した培地の分注量は 10 mL とする。
- 7) 抽出溶媒 アセトン-水-塩酸 (25+25+1)

B 試料溶液の調製

1) 分析試料に MN 又は LS を含まない場合

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、10 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。ろ液 10 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水で pH を 4.4~4.6 に調整する。この液全量を希釈溶媒で 100 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで希釈溶媒を加えた後、ろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

2) 分析試料に MN 又は LS を含む場合

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、10 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。ろ液 20 mL を 100 mL の共栓遠心沈殿管に正確に入れ、水 20 mL を正確に加え、更にクロロホルム 5 mL を加えて振り混ぜた後、1,500×g で 5 分間遠心分離する。水-アセトン層（上層）20 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水で pH を 4.4~4.6 に調整する。この液全量を希釈溶媒で 100 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで希釈溶媒を加えた後、ろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

ただし、標準液及び試料溶液の分注量は 50 µL とし、各寒天平板は培養前に 10~20 °C で 3 時間静置する。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用プレミックス	2~10	3	100.3~109.0	5.6
中すう用プレミックス	2~10	3	99.0~110.3	5.4
プロイラー用プレミックス	2~10	3	99.0~106.7	7.6

・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
中すう用プレミックス	7	5	99.6	5.2	5.2

3.2 定量試験法（飼料）

3.2.1 平板法

（適用範囲：MN 又は LS を含まない飼料）

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 1号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 1号緩衝液－アセトン（7+3）の pH を塩酸（6 mol/L）で 4.4~4.6 に調整し、希釈溶媒とする。
- 3) アボパルシン標準液 3.1.1 の A の 3)により 1 mg(力価)/mL のアボパルシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、4 μg(力価)/mL、2 μg(力価)/mL、1 μg(力価)/mL、0.5 μg(力価)/mL 及び 0.25 μg(力価)/mL の各標準液を調製する。
- 4) 培地 F-20 号培地
- 5) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 11774 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.2mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。
ただし、孢子液を添加した培地の分注量は 10 mL とする。
- 7) 抽出溶媒 アセトン－塩酸（0.4 mol/L）（3+2）

B 試料溶液の調製

分析試料の一定量（AV として 0.2 mg(力価)相当量）を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液 25 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水（6 mol/L）で pH を 4.4~4.6 に調整する。この液全量を 1 号緩衝液で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 1 号緩衝液を加えた後、ろ紙（5 種 A）でろ過し、1 μg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

ただし、標準液及び試料溶液の分注量は 50 μL とし、各寒天平板は培養前に 10~20 °C で 3 時間静置する。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	7.5~30	3	102.4~104.4	11.8
中すう用配合飼料	7.5~30	3	95.2~100.1	13.6
プロイラー後期用配合飼料	7.5~30	3	100.7~108.5	15.5

- ・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
プロイラー 後期用配合飼料	6	10	100.2	6.1	6.5

4 アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン又は塩酸オキシテトラサイクリン

4.1 定量試験法（プレミックス）

4.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 1号緩衝液
- 2) オキシテトラサイクリン標準液 常用標準オキシテトラサイクリン 40 mg以上を正確に量り、塩酸（0.01 mol/L）を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mLのオキシテトラサイクリン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を 1号緩衝液で正確に希釈し、5 µg(力価)/mLの高濃度標準液及び 1.25 µg(力価)/mLの低濃度標準液を調製する。
- 3) 培地 F-4号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、100倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 メタノール-塩酸（4 mol/L）（49+1）

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5種 A）でろ過する。

ろ液の一定量を 1号緩衝液で正確に希釈し、5 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 1.25 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以内)
塩酸オキシテトラサイクリン	ビタミンプレミックス	5~20	3	98.5~99.8	1.7
	ビタミン・ミネラル プレミックス	5~20	3	98.6~99.6	1.6

4.2 定量試験法（飼料）

4.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 1号緩衝液
- 2) オキシテトラサイクリン標準液 4.1.1 の A の 2)により 1 mg(力価)/mL のオキシテトラサイクリン標準原液を調製する。
 - i) OTC が 20 g(力価)/t 以上の場合
使用に際して、標準原液の一定量を 1号緩衝液-メタノール（3+1）で正確に希釈し、8 µg(力価)/mL、4 µg(力価)/mL、2 µg(力価)/mL、1 µg(力価)/mL

及び 0.5 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

ii) OTC が 20 g(力価)/t 未満の場合

使用に際して、標準原液の一定量を 1 号緩衝液—メタノール (3+1) で正確に希釈し、1.6 µg(力価)/mL、0.8 µg(力価)/mL、0.4 µg(力価)/mL、0.2 µg(力価)/mL 及び 0.1 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

3) 培地 F-17 号培地

4) 孢子液及び添加量

i) OTC が 20 g(力価)/t 以上の場合

試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 11778 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。

ii) OTC が 20 g(力価)/t 未満の場合

試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 11778 を用い、 1×10^5 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。

5) 寒天平板 孢子液を一度融かして 49~51 °C に保温した培地に加えて十分にかき混ぜ、15 mL をペトリ皿に一様に広がるように分注した後、水平に静置して凝固させる。更に、この上に培地 5 mL を一様に広がるように分注した後、水平に静置して凝固させる。以下、せん孔法による。

6) 抽出溶媒 1 号緩衝液—メタノール—塩酸 (4 mol/L) (50+49+1)

B 試料溶液の調製

1) OTC が 20 g(力価)/t 以上の場合

分析試料の一定量 (OTC として 0.4 mg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液 25 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水 (6 mol/L) で pH を 4.4~4.6 に調整する。この液全量を 1 号緩衝液で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 1 号緩衝液を加えた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過し、2 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

2) OTC が 20 g(力価)/t 未満の場合

i) MN を含まない場合

分析試料の一定量 (OTC として 80 µg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液 25 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水 (6 mol/L) で pH を 4.4~4.6 に調整する。この液全量を 1 号緩衝液で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 1 号緩衝液を加えた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過し、0.4 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

ii) MN を含む場合

分析試料の一定量 (OTC として 80 µg(力価)相当量) を正確に量って 200

mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液 25 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、塩酸で pH を 1.0 以下に調整した後 1 時間静置し、更にアンモニア水（6 mol/L）で pH を 4.4~4.6 に調整する。この液全量を 1 号緩衝液で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 1 号緩衝液を加えた後、ろ紙（5 種 A）でろ過し、0.4 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

(参考) 分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以内)
塩酸オキシテトラサイクリン	幼すう用配合飼料	5~100	6	98.3~103.7	3.3
	ほ乳期子豚用配合飼料	5~100	6	104.4~109.2	5.8
	ほ乳期子牛用配合飼料	5~100	6	100.9~106.9	7.4

- ・共同試験

添加成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
塩酸オキシテトラサイクリン	子牛用配合飼料	3	50	106.3	4.5	14.3

4.2.2 液体クロマトグラフ法

(適用範囲：OTC が 10 g(力価)/t 以上の飼料)

A 試薬の調製

- 1) 緩衝液 1 号緩衝液
- 2) 抽出溶媒 1 号緩衝液－メタノール－塩酸（4 mol/L）（50+49+1）
- 3) オキシテトラサイクリン標準液 4.1.1 の A の 2)により 1 mg(力価)/mL のオキシテトラサイクリン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にオキシテトラサイクリンとして 0.1~5.0 µg(力価)相当量を含む数点のオキシテトラサイクリン標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 4~5 g (OTC として 0.4 mg(力価)相当量以下) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 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 試料溶液及び各オキシテトラサイクリン標準液各 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：蛍光検出器（励起波長：380 nm、蛍光波長：520 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：イミダゾール緩衝液^{注2}－メタノール（77+23）
 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又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のオキシテトラサイクリン量をアルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン量として算出する。

注 1 Shim-pack VP-ODS（島津製作所製）又はこれと同等のもの

2 イミダゾール 68.08 g、酢酸マグネシウム四水和物 10.72 g 及びエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 0.37 g を量って水 750 mL に溶かし、酢酸 25 mL 程度を加えて pH を 7.1~7.3 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL 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

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以内)
アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン	中すう育成用配合飼料	10~100	3	95.9~100.7	2.1
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	10~100	3	96.6~103.7	3.5
	ほ乳期子牛育成用配合飼料	10~100	3	93.3~100.9	3.9

・共同試験

添加成分名	試料の種類	試験室数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン	中すう育成用配合飼料	7	50	95.6	1.3	3.9

5 エフロトマイシン

5.1 定量試験法（プレミックス）

5.1.1 平板法

A 試薬等の調製

1) 緩衝液

i) 2号緩衝液

ii) 12号緩衝液

2) 希釈溶媒 2号緩衝液－メタノール（4+1）

3) エフロトマイシン標準液 常用標準エフロトマイシン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、12号緩衝液－アセトニトリル（4+1）を正確に加えて溶かし、0.4 mg(力価)/mL のエフロトマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、1.6 μg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.4 μg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

- 4) 培地 F-6号培地
- 5) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 19637 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 1.0 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。
- 7) 抽出溶媒 アセトン-水-アンモニア水 (200+49+1)

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、 $1.6 \mu\text{g}$ (力価)/mL の高濃度試料溶液及び $0.4 \mu\text{g}$ (力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

ただし、各寒天平板は、27~29 °C で 16~24 時間培養する。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
豚用プレミックス	1~8	3	97.6~102.3	2.9
豚用プレミックス	1~8	3	99.0~102.0	5.4
豚用プレミックス	1~8	3	100.5~102.5	5.0

- ・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
豚用プレミックス	7	3	98.5	1.8	4.0

5.2 定量試験法 (飼料)

5.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液
 - i) 2号緩衝液
 - ii) 12号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 2号緩衝液-メタノール (4+1)
- 3) エフロトマイシン標準液 5.1.1 の A の 3)により 0.4 mg (力価)/mL のエフロトマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、 $1.6 \mu\text{g}$ (力価)/mL、 $0.8 \mu\text{g}$ (力価)/mL、 $0.4 \mu\text{g}$ (力価)/mL、 $0.2 \mu\text{g}$ (力価)/mL 及び $0.1 \mu\text{g}$ (力価)/mL の各標準液を調製する。
- 4) 培地 F-6号培地
- 5) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 19637 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 1 mL 程度加える。

6) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料の一定量 (ET として 0.04~0.32 mg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、ジクロロメタン 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×g で 10 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙 (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 シリカゲルミニカラム (690 mg) をジクロロメタン 20 mL で洗浄する。

試料溶液 10 mL をミニカラムに入れ、そのミニカラムのリザーバー内の残量が 1 mL に達するまで自然流下させる^{注1}。更に、酢酸エチル-アンモニア水 (180+1) 20 mL をミニカラムに加え洗浄する。ミニカラムの下に 50 mL のなす形フラスコを置き、メタノール 20 mL をミニカラムに加えて ET を溶出させる。

溶出液を 50 °C の水浴で減圧乾固した後、メタノール 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、更に、2 号緩衝液 8 mL を正確に加えて振り混ぜ、必要があれば、その溶液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、0.4 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

ただし、各寒天平板は、27~29 °C で 16~24 時間培養する。

注 1 自然流下が困難な場合には、圧注して流速を約 1 mL/min とする。以下、洗浄及び溶出操作も同様とする。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率

試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)
豚用配合飼料(マッシュ)	6	92.0
豚用配合飼料(クランブル)	6	99.0
豚用配合飼料(マッシュ)	8	95.0

・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
ほ乳期子豚用配合飼料	8	8	103.8	3.4	5.2

6 エンボン酸スピラマイシン

6.1 定量試験法 (プレミックス)

6.1.1 平板法

A 試薬等の調製

1) 緩衝液

- i) 4号緩衝液
- ii) 10号緩衝液
- 2) スピラマイシン標準液 常用標準スピラマイシン又はこれと同等のもの40 mg以上を正確に量り、メタノール少量を正確に加えて溶かし、更に4号緩衝液を正確に加えて1 mg(力価)/mLのスピラマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を4号緩衝液で正確に希釈し、4 µg(力価)/mLの高濃度標準液及び1 µg(力価)/mLの低濃度標準液を調製する。
- 3) 培地 F-7号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、10倍に希釈した菌液を培地100 mLに対して0.2 mL程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 メタノール-10号緩衝液 (7+3)

B 試料溶液の調製

分析試料3~5 gを正確に量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒100 mLを加え、20分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙(5種A)でろ過する。

ろ液の一定量を4号緩衝液で正確に希釈し、4 µg(力価)/mLの高濃度試料溶液及び1 µg(力価)/mLの低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ビタミンプレミックス	1~10	3	99.1~99.9	0.5
ビタミン・ミネラル プレミックス	1~10	3	99.1~100.2	0.8

- ・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
豚用プレミックス	7	3	98.5	1.8	4.0

6.2 定量試験法 (飼料)

6.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 4号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 4号緩衝液-メタノール (7+3)
- 3) スピラマイシン標準液 6.1.1のAの2)により1 mg(力価)/mLのスピラマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、1.6 µg(力価)/mL、0.8 µg(力価)/mL、0.4 µg(力価)/mL、0.2 µg(力価)/mL 及び 0.1 µg(力

価)/mL の各標準液を調製する。

- 4) 培地 F-7号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 円筒法による。

B 試料溶液の調製

- 1) 分析試料に MN を含まない場合
 - i) SP が 50 g(力価)/t 以上の場合
分析試料の一定量 (SP として 0.5 mg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトン 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (6 種) でろ過する。
ろ液 24 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C の水浴で減圧乾固した後、希釈溶媒 15 mL を正確に加えて残留物を溶かす。更に、ヘキサン 5 mL を加えて振り混ぜた後、この液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離する。水-メタノール層 (下層) の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、0.4 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。
 - ii) SP が 20 g(力価)/t 以上 50 g(力価)/t 未満の場合
分析試料の一定量 (SP として 0.2 mg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトン 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (6 種) でろ過する。
以下、i)による。
 - iii) SP が 20 g(力価)/t 未満の場合
分析試料の一定量 (SP として 50 µg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトン 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (6 種) でろ過する。
以下、i)による。
- 2) 分析試料に MN を含む場合
 - i) SP が 50 g(力価)/t 以上の場合
分析試料の一定量 (SP として 0.5 mg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトン 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (6 種) でろ過する。
ろ液 24 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C の水浴で減圧乾固した後、希釈溶媒 15 mL を正確に加えて残留物を溶かす。更に、ヘキサン 5 mL を加えて振り混ぜた後、この液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離する。水-メタノール層 (下層) 10 mL を 20 mL のビーカーに正確に入れ、塩酸で pH を 1.0 以下に調整した後 1 時間静置し、更にアンモニア水で pH を 7.9~8.1 に調整する。この液全量を希釈溶媒で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで希釈溶媒を加え、ろ紙 (5 種 A) でろ過した後、ろ液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、0.4 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

ii) SP が 20 g(力価)/t 以上 50 g(力価)/t 未満の場合

分析試料の一定量 (SP として 0.2 mg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトン 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (6 種) でろ過する。

以下、i)による。

iii) SP が 20 g(力価)/t 未満の場合

分析試料の一定量 (SP として 50 µg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトン 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出し、抽出液をろ紙 (6 種) でろ過する。

ろ液 24 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C の水浴で減圧乾固した後、希釈溶媒 15 mL を正確に加えて残留物を溶かす。更に、ヘキサン 5 mL を加えて振り混ぜた後、この液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離する。水-メタノール層 (下層) 10 mL を 20 mL のビーカーに正確に入れ、塩酸で pH を 1.0 以下に調整した後 1 時間静置し、更にアンモニア水で pH を 7.9~8.1 に調整する。この液全量を希釈溶媒で 20 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで希釈溶媒を加えた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過し、0.4 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	5~20	6	100.5~101.0	1.5
ブロイラー用配合飼料	5~20	6	100.5~102.0	2.4
子豚用配合飼料	5~100	6	99.5~102.5	3.5

・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
ほ乳期子豚用配合飼料	7	10	97.1	4.5	8.6

7 エンラマイシン

7.1 定量試験法 (プレミックス)

7.1.1 平板法

A 試薬等の調製

1) 緩衝液 4号緩衝液

2) エンラマイシン標準液 常用標準エンラマイシン適量を減圧下 (0.27 kPa 以下)、60 °C で 3 時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、メタノール-水 (4+1) を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のエンラマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を 4 号緩衝液で正確に希釈し、4 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 1 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

- 3) 培地 F-111 号
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用い、100 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 リン酸 (0.075 mol/L) - アセトン (2+1)

B 試料溶液の調製

- 1) 分析試料に SL、NR 又は MN を含まない場合

分析試料 1~4 g (ER として 10 mg(力価)相当量以下) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液 25 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水で pH を 7.9~8.1 に調整する。この液全量を 4 号緩衝液で 100 mL の全量フラスコに移し、標線まで 4 号緩衝液を加えた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液の一定量を 4 号緩衝液で正確に希釈し、4 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 1 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

- 2) 分析試料に SL、NR 又は MN を含む場合

分析試料 1~4 g (ER として 10 mg(力価)相当量以下) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出し、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液 25 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、塩酸で pH を 1.0 以下に調整した後 1 時間静置し、更にアンモニア水で pH を 7.9~8.1 に調整する。この液全量を 4 号緩衝液で 100 mL の全量フラスコに移し、標線まで 4 号緩衝液を加えた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液の一定量を 4 号緩衝液で正確に希釈し、4 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 1 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
鶏用プレミックス	0.5~10	3	94.6~100.6	5.0
鶏用プレミックス	0.5~10	3	97.0~99.9	4.3
豚用プレミックス	0.5~10	3	93.6~95.7	2.5

- ・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
鶏用プレミックス	7	5	97.4	0.9	3.1

7.2 定量試験法（飼料）

7.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 3号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 3号緩衝液－アセトン（7+3）
- 3) エンラマイシン標準液 7.1.1のAの2)により1 mg(力価)/mLのエンラマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、1.6 µg(力価)/mL、0.8 µg(力価)/mL、0.4 µg(力価)/mL、0.2 µg(力価)/mL及び0.1 µg(力価)/mLの各標準液を調製する。
- 4) 培地 F-21号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用い、10倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。
- 7) 抽出溶媒 塩酸（0.5 mol/L）－アセトン（7+3）

B 試料溶液の調製

- 1) 分析試料に SL 又は MN を含まない場合
分析試料の一定量（ER として 80 µg(力価)相当量）を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙（5種 A）でろ過する。
ろ液 25 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水（6 mol/L）で pH を 5.9~6.1 に調整する。この液全量を希釈溶媒で 50 mL の全量フラスコに移し、標線まで希釈溶媒を加えた後、ろ紙（5種 A）でろ過し、0.4 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。
- 2) 分析試料に SL 又は MN を含む場合
分析試料の一定量（ER として 80 µg(力価)相当量）を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙（5種 A）でろ過する。
ろ液 25 mL を正確に量って 50 mL のビーカーに入れ、1 時間静置した後、アンモニア水（6 mol/L）で pH を 5.9~6.1 に調整する。この液全量を希釈溶媒で 50 mL の全量フラスコに移し、標線まで希釈溶媒を加えた後、ろ紙（5種 A）でろ過し、0.4 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	5~20	4	94.6~100.6	5.0
中すう用配合飼料	5~20	4	97.0~99.9	4.3
ほ乳期子豚用配合飼料	5~20	4	97.0~99.10	5.3
子豚育成用配合飼料	5~20	4	93.6~95.7	2.5

・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
ほ乳期子豚用配合飼料	5	10	100.1	5.5	8.6

8 オリエンチシン

8.1 定量試験法 (飼料)

8.1.1 平板法

A 試薬等の調製

1) 緩衝液

i) 1号緩衝液

ii) 3号緩衝液

2) 希釈溶媒 3号緩衝液-メタノール (4+1)

3) オリエンチシン標準液 常用標準オリエンチシン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、1号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のオリエンチシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、3.2 µg(力価)/mL、1.6 µg(力価)/mL、0.8 µg(力価)/mL、0.4 µg(力価)/mL 及び 0.2 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

4) 培地 F-11号培地

5) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^8 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。

6) 寒天平板 せん孔法による。

7) 抽出溶媒 メタノール-塩酸 (0.2 mol/L) (1+1)

8) 溶出溶媒 アセトニトリル 80 mL に水を加えて 1,000 mL とした後、塩酸 (1 mol/L) を用いて pH を 2.9~3.1 に調整する。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料の一定量 (OR が 5 g(力価)/t 以上の場合には、OR として 0.1 mg(力価)相当量、5 g(力価)/t 未満の場合には、OR として 50 µg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 15 分間遠心分離した後、上澄み液 40 mL を 100 mL のビーカーに正確にとり、アンモニア水 (3 mol/L) で pH を 5.9~6.1 に調整する。この液全量をメタノール

で 100 mL の全量フラスコに移し、標線までメタノールを加えた後、ろ紙（5 種 A）でろ過する。ろ液 50 mL を 200 mL のなす形フラスコに入れ、50 °C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。水 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、この液をろ紙（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 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（820 mg）^{注1}をアセトン 30 mL 及び水 15 mL で順次洗浄する。

試料溶液 2 mL 又は 4 mL（試料の採取量を 0.1 mg(力価)相当量とした場合は 2 mL、試料の採取量を 50 µg(力価)相当量とした場合は 4 mL）をミニカラムに正確に入れ、圧注^{注2}して流出させる。水-アセトンニトリル（97+3）15 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。50 mL のビーカーをミニカラムの下に置き、溶出溶媒 15 mL をミニカラムに加え、圧注^{注2}して OR を溶出させる。溶出液の pH を水酸化カリウム溶液（0.01 w/v%）で 5.9~6.1 に調整し、この液全量を溶出溶媒で 100 mL のなす形フラスコに移し、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。

希釈溶媒 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、0.8 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

注 1 Sep-Pak Plus C₁₈ Environmental Cartridge（Waters 製）又はこれと同等のもの

2 流速は、0.5 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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	2.5~10	3	99.3~108.7	18.5
プロイラー前期用配合飼料	2.5~10	3	96.7~104.3	15.6
プロイラー後期用配合飼料	2.5~10	3	95.0~114.7	7.0

・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
幼すう用配合飼料	6	5	99.8	6.5	6.5

9 キタサマイシン

9.1 定量試験法（プレミックス）

9.1.1 平板法

A 試薬等の調製

1) キタサマイシン標準液 常用標準キタサマイシン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、メタノール 10 mL を加えて溶かし、更に水を正確に

加えて 1 mg(力価)/mL のキタサマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を水で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

- 2) 培地 F-3 号培地
- 3) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。
- 4) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液の一定量を水で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ビタミンプレミックス	1~5	3	99.7~100.1	1.3
ビタミン・ミネラルプレミックス	1~5	3	99.9~100.7	1.3

9.2 定量試験法 (飼料)

9.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 4 号緩衝液
- 2) キタサマイシン標準液 9.1.1 の A の 1) により 1 mg(力価)/mL のキタサマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を 4 号緩衝液-メタノール (7+3) で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL、1 µg(力価)/mL、0.5 µg(力価)/mL、0.25 µg(力価)/mL 及び 0.125 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。
- 3) 培地 F-3 号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、100 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

- 1) KT が 20 g(力価)/t 以上の場合

分析試料の一定量 (KT として 0.5 mg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、ヘキサン 10 mL (分析試料の採取量が 10 g 以上の場合には 20 mL) 及びメタノール 50 mL を加え、20 分間かき混ぜる。更に

4号緩衝液 50 mL を加え、2~3 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離する。水-メタノール層（下層）をろ紙（5種 A）でろ過する。

ろ液の一定量を 4号緩衝液-メタノール（18+7）で正確に希釈し、0.5 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

2) KT が 20 g(力価)/t 未満の場合

分析試料の一定量（KT として 0.1 mg(力価)相当量）を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、ヘキサン 10 mL（分析試料の採取量が 10 g 以上の場合には 20 mL）及びメタノール 50 mL を加え、20 分間かき混ぜる。更に 4号緩衝液 50 mL を加え、2~3 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離する。水-メタノール層（下層）をろ紙（5種 A）でろ過する。

ろ液の一定量を 4号緩衝液-メタノール（9+1）で正確に希釈し、0.5 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

（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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	5.6~11	6	99.3~99.7	1.3
プロイラー前期用配合飼料	5.6~11	6	100.6~100.9	1.4
ほ乳期子豚用配合飼料	5.6~100	6	100.3~100.9	2.1

- ・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
ほ乳期子豚用配合飼料	5	100	101.9	4.4	9.4

9.3 微量定量試験法

9.3.1 KT、VM 及び TS のバイオオートグラフによる微量定量試験法

（適用範囲：飼料）

第 3 節 2 による。

9.4 確認試験法（プレミックス）

9.4.1 バイオオートグラフ法

A 試薬等の調製

- 1) キタサマイシン標準液 9.1.1 の A の 1)により 1 mg(力価)/mL のキタサマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を 10 µg(力価)/mL になるようにメタノールで正確に希釈した後、更にアンモニア水を等量加えて 5 µg(力価)/mL のキタ

サマイシン標準液を調製する。

- 2) 培地 F-111号培地
- 3) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 4) 展開溶媒 アセトニトリル-メタノール (17+3)
- 5) 発色液 3-(4-ヨードフェニル)-2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウムクロリド 100 mg を水に溶かして 200 mL とする。

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液の一定量をメタノールで希釈し、10 µg(力価)/mL の濃度に調製した後、アンモニア水を等量加えて 5 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 同定

第 1 節 2 の C の薄層クロマトグラフィー、寒天平板の調製、培養及び同定の項による。

ただし、薄層板はシリカゲル薄層板^{注 1}を用い、展開溶媒の上達線が薄層板の上端に達するまで展開する。

注 1 TLC plate Silica gel 60 (20×20 cm) (Merck 製) 又はこれと同等のものを 110 °C で 2 時間乾燥して用いる。

10 クロラムフェニコール

10.1 微量定量試験法

- 10.1.1 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による単成分分析法 (その 1)
(適用範囲: 魚粉及び配合飼料 (脱脂粉乳を主原料とするものを除く。))

A 試薬の調製

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

更に、標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中にクロラムフェニコールとして 0.5 µg を含有する標準液を調製する。

使用に際して、先の標準液の一定量を水-アセトニトリル (7+3) で正確に希釈し、1 mL 中にクロラムフェニコールとして 0.05 µg を含有するクロラムフェニコール標準液を調製する。

- 2) 内標準液 安定同位体元素標識クロラムフェニコール (CP-d₅) 標準原液 (濃度 100 µg/mL)^{注 1} 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線までアセトニトリルを加えて 1 mL 中に CP-d₅ として 1 µg を含有する標準液を調製する。

使用に際して、先の標準液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に CP-d₅ として 50 ng を含有する内標準液を調製する。

- 3) 検量線作成用標準液 クロラムフェニコール標準液及び内標準液の一定量を水-アセトニトリル (7+3) で正確に希釈し、1 mL 中にクロラムフェニコールとして 1~20 ng を含有し、かつ CP-d₅ として 2.5 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 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、内標準液 1 mL を正確に加える。更にメタノール-1 %メタリン酸溶液 (3+2) 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、抽出液をあらかじめケイソウ土を 2 mm の厚さにのせたガラス繊維ろ紙で吸引ろ過する。先の三角フラスコ及び残さを順次水 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過し、更に全量フラスコの標線まで水を加える。この液 20 mL を 300 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 10 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I ^{注 2} 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 (60 mg) ^{注 3} をメタノール 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、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 10 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。水-メタノール (4+1) 4 mL をミニカラムに加え、ミニカラムを洗浄した後、吸引マニホールドを用いて 10 分間減圧しミニカラム内の水分を除去する。

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 10 mL をミニカラムに加えてクロラムフェニコールを溶出させ、溶出液をカラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II 中性アルミナミニカラム (1,710 mg) ^{注 4} をアセトニトリル 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。更にアセトニトリル 5 mL をミニカラムに加え、同様に流出させる。

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-水 (19+1) 40 mL をミニカラムに加えてクロラムフェニコールを溶出させる。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-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、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 2.2 µm) ^{注 5}

溶 離 液：10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液－アセトニトリル (7+3) (1 min 保持) → 9 min → (1+19) (10 min 保持) → 0.1 min → (7+3) (10 min 保持)

流 速：0.18 mL/min

カ ラ ム 槽 温 度：40 °C

(タンデム型質量分析計部^{注6)})

イ オ ン 化 法：エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (負イオンモード)

ネ ブ ラ イ ザ ー ガ ス：N₂ (600 L/h)

コ ー ン ガ ス：N₂ (50 L/h)

コ ー ン 電 圧：25 V

キャピラリー電圧：1 kV

コリジョンエネルギー：20 eV

イ オ ン 源 温 度：120 °C

モ ニ タ ー イ オ ン：下表のとおり

表 各物質のモニターイオン条件

物質名	プリカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	確認 イオン(m/z)
クロラムフェニコール	321	152	257
クロラムフェニコール-d ₅	326	157	—

計 算 得られた選択反応検出クロマトグラムからクロラムフェニコール及び CP-d₅ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のクロラムフェニコール量を算出する。

注 1 和光純薬工業製又はこれと同等のもの

2 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。

3 Oasis HLB (Waters 製、リザーバー容量 3 mL) 又はこれと同等のもの

4 Sep-Pak Plus Alumina N (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

5 Shim-pack XR-ODS II (島津製作所製、本測定条件によるクロラムフェニコールの保持時間は約 5 分) 又はこれと同等のもの

6 Quattro micro API Mass Analyzer (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

試料の種類	添加濃度 (µg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
魚粉	2~25	3	98.4~107	9.4
ブロイラー肥育前期用配合飼料	5~25	3	94.2~101	12
ほ乳期子豚育成用配合飼料	5~25	3	99.0~101	5.5
ぎんざけ育成用配合飼料	2~25	3	89.6~97.7	12

・共同試験

試料の種類	試験室数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
魚粉	8	5	104	4.8	5.6	0.25
ブローラー肥育 前期用配合飼料	8	5	104	4.5	5.5	0.25

・検出下限 試料中 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$

10.1.2 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による単成分分析法（その2）
（適用範囲：脱脂粉乳）

A 試薬の調製

- 1) クロラムフェニコール標準液 クロラムフェニコール [$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$] 10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、さらに標線まで同溶媒を加えてクロラムフェニコール標準原液を調製する（この液 1 mL は、クロラムフェニコールとして 0.1 mg を含有する。）。
さらに、標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中にクロラムフェニコールとして 1 μg を含有するクロラムフェニコール標準液を調製する。
- 2) 内標準原液 安定同位体元素標識クロラムフェニコール（CP-d₅）標準原液（濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）^{注1} 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線までアセトニトリルを加えて 1 mL 中に CP-d₅ として 1 μg を含有する内標準原液を調製する。
- 3) 検量線作成用標準液 内標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に CP-d₅ として 250 ng を含有する内標準液を調製する。さらに、クロラムフェニコール標準液及び先の内標準液の一定量を水-アセトニトリル（7+3）で正確に希釈し、1 mL 中にクロラムフェニコールとして 0.1~20 ng を含有し、かつ CP-d₅ として 2.5 ng を含有する数点の検量線作成用標準液を調製する。
- 4) 添加用内標準液 使用に際して内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 CP-d₅ として 25 ng を含有する添加用内標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 5 g を正確に量って 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、添加用内標準液 1 mL を正確に加える。さらにメタノール-1 w/v%メタリン酸溶液（3+2）100 mL を加え^{注2}、ホモジナイザー^{注3}で 1 分間かき混ぜて抽出する。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をあらかじめケイソウ土を 2 mm の厚さにのせたろ紙（5 種 B）で吸引ろ過する。先の共栓遠心沈殿管及び残さを順次水 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過し、さらに全量フラスコの標線まで水を加える。この液 20 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 10 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^{注4} ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（60 mg）^{注5} をメタノール 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、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出させる。さらに水 10 mL を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、メタノール 10 mL をミニカラムに加えてクロラムフェニコールを溶出させる。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。

水-アセトニトリル (7+3) 1 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)^{注6} でろ過し、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

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 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)^{注7}

溶離液 : 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (7+3) (1 min 保持) → 9 min → (1+19) (10 min 保持) → 0.1 min → (7+3) (10 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8})

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

ネブライザーガス : 340 kPa

乾燥ガス温度 : 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 各物質のモニターイオン条件

物質名	プリカーサー イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)	確認 イオン (m/z)	フラグメンター 電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
クロラムフェニコール	321	152	— 257	100	10 5
クロラムフェニコール-d5	326	157	—	100	15

計算 得られた選択反応検出クロマトグラムからクロラムフェニコール及び CP-d₅ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のクロラムフェニコール量を算出する。

注 1 Cambrige Isotope Laboratories Inc.製アセトニトリル溶液又はこれと同等

のもの

- 2 メタノール-1 w/v%メタリン酸溶液 (3+2) 100 mL を加える際に、脱脂粉乳が固まる場合は、まず同溶液 50 mL を加え、ガラス棒等で脱脂粉乳の固まりを砕いた後、残りの 50 mL をガラス棒等を洗浄しながら加える。
- 3 HG-200 (Hsiangtai 製) 又はこれと同等のもの
- 4 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。
- 5 Oasis HLB (Waters 製、リザーバー容量 3 mL) 又はこれと同等のもの
- 6 クロラムフェニコールの吸着性のないもの
- 7 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製、本測定条件によるクロラムフェニコールの保持時間は約 5.5 分) 又はこれと同等のもの
- 8 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

試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
脱脂粉乳1	25	3	95.4	2.7
	1	3	94.2	6.2
	0.5	3	99.3	7.3
脱脂粉乳2	25	3	96.4	1.2
	1	3	102	1.0
	0.5	3	93.8	12
脱脂粉乳3	25	3	95.2	3.4
	1	3	98.7	3.7
脱脂粉乳4	25	3	99.4	5.8
	1	3	99.6	3.1

- ・ 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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
脱脂粉乳1	11	0	5	106	4.3	7.2	0.58
脱脂粉乳2	11	0	5	105	4.9	9.9	0.79

- ・ 検出下限 試料中 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

10.1.3 液体クロマトグラフ法

(適用範囲：脱脂粉乳)

A 試薬の調製

- 1) クロラムフェニコール標準液 クロラムフェニコール [$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$] 20 mg を正確に量って 200 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてクロラムフェニコール標準原液を調製する (この液 1 mL は、クロラムフェニコールとして 0.1 mg を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量をアセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にクロラムフェニコールとして 0.025~0.5 µg を含有する数点のクロラムフェニコール標準液を調製する。

- 2) シリカゲル カラムクロマトグラフ用シリカゲル (粒径 63~200 µm (230~70 メッシュ)) 注¹を 110 °C で 2 時間乾燥する。

B 定 量

抽出 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、酢酸エチル 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液 50 mL を 100 mL のなす形フラスコに入れ、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、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 シリカゲル 5 g をクロロホルムに懸濁させてカラム管 (内径 15 mm) に流し込み、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させ、カラムを調製する。

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クロロホルム 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加える。液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流速 1~2 mL/min で流出させた後、クロロホルム-メタノール (97+3) 30 mL をカラムに加え、同様に流出させ、カラムを洗浄する。

50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、クロロホルム-メタノール (7+3) 30 mL をカラムに加え、先の流速でクロラムフェニコールを溶出させる。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。

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、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 試料溶液及び各クロラムフェニコール標準液各 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 278 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²

溶 離 液：水-アセトニトリル (29+11)

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、試料中のクロラムフェニコール量を算出する。

注 1 Silica gel 60 (Merck 製) 又はこれと同等のもの

2 YMC-Pack ODS-AM (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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
脱脂粉乳1	10~50	3	96.0~101.9	3.8
脱脂粉乳2	10~50	3	96.3~96.5	10.0

・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
脱脂粉乳	9	10	98.1	4.7	6.4	0.29

・ 定量下限 試料中 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

11 クロルテトラサイクリン

11.1 定量試験法 (プレミックス)

11.1.1 平板法 (その1)

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 1号緩衝液
- 2) クロルテトラサイクリン標準液 常用標準クロルテトラサイクリン適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で3時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、水を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のクロルテトラサイクリン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を1号緩衝液で正確に希釈し、4 μg (力価)/mL の高濃度標準液及び1 μg (力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 3) 培地 F-4号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、菌液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 水-アセトン-塩酸 (51+40+9)

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5種 A) でろ過する。

ろ液の一定量を1号緩衝液で正確に希釈し、4 μg (力価)/mL の高濃度試料溶液及び1 μg (力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ビタミンプレミックス	10~40	3	99.3~100.2	1.7
ビタミン・ミネラルプレミックス	10~40	3	99.1~101.1	1.0

11.1.2 平板法 (その2)

(適用範囲: ミネラル含量の多いプレミックス)

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 11号緩衝液
- 2) クロルテトラサイクリン標準液 11.1.1のAの2)により1 mg(力価)/mLのクロルテトラサイクリン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を11号緩衝液で正確に希釈し、4 µg(力価)/mLの高濃度標準液及び1 µg(力価)/mLの低濃度標準液を調製する。
- 3) 培地 F-4号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、菌液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 水-アセトン-塩酸 (51+40+9)

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、2,4,6-トリ-2-ピリジル-1,3,5-トリアジン 3 g 及び抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液 5 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、11号緩衝液 30 mL を加えた後、水酸化ナトリウム溶液 (2 mol/L) で pH を 3.9~4.1 に調整する。この液全量を 11号緩衝液で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 11号緩衝液を加えた後、この液の一定量を 11号緩衝液で正確に希釈し、4 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 1 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
鶏用プレミックス	10~50	3	100.0~102.3	3.6
豚用プレミックス	10~50	3	95.7~100.3	4.8
牛用プレミックス	10~50	3	96.3~101.0	4.3

・共同試験

試料の種類	試験室数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
牛用プレミックス	8	20	100.2	2.3	3.0

11.2 定量試験法（飼料）

11.2.1 平板法（その1）

（適用範囲：CTCが20 g(力価)/t以上の飼料）

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 1号緩衝液
- 2) クロルテトラサイクリン標準液 11.1.1のAの2)により1 mg(力価)/mLのクロルテトラサイクリン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を1号緩衝液－アセトン（4+1）で正確に希釈し、8 µg(力価)/mL、4 µg(力価)/mL、2 µg(力価)/mL、1 µg(力価)/mL及び0.5 µg(力価)/mLの各標準液を調製する。
- 3) 培地 F-4号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、10倍に希釈した菌液をF-4号培地100 mLに対して0.5 mL程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 水－アセトン－塩酸（51+40+9）

B 試料溶液の調製

分析試料の一定量（CTCとして0.4 mg(力価)相当量）を正確に量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒100 mLを加え、20分間かき混ぜて抽出する。抽出液を50 mLの共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×gで5分間遠心分離し、上澄み液をろ紙（5種A）でろ過する。

ろ液25 mLを50 mLのビーカーに正確に入れ、アンモニア水でpHを4.4~4.6に調整する。この液全量を1号緩衝液で50 mLの全量フラスコに移し、更に標線まで1号緩衝液を加えた後、ろ紙（5種A）でろ過して2 µg(力価)/mLの試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

（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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	50~100	6	94.3~99.8	3.7
ほ乳期子豚用配合飼料	50~100	6	96.3~96.8	3.2
ほ乳期子牛用配合飼料	50~100	6	97.7~98.2	3.4

・共同試験

試料の種類	試験室数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
子牛用配合飼料	3	50	101.6	3.1	6.9

11.2.2 平板法 (その2)

(適用範囲: CTC が 20 g(力価)/t 未満の飼料)

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 1号緩衝液
- 2) クロルテトラサイクリン標準液 11.1.1のAの2)により1 mg(力価)/mLのクロルテトラサイクリン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を1号緩衝液-アセトン(4+1)で正確に希釈し、1.28 µg(力価)/mL、0.64 µg(力価)/mL、0.32 µg(力価)/mL、0.16 µg(力価)/mL及び0.08 µg(力価)/mLの各標準液を調製する。
- 3) 培地 F-17号培地
- 4) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 11778 を用い、 1×10^6 個/mLの孢子液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 孢子液を一度融かして 49~51 °C に保温した培地に加えて十分にかき混ぜ、15 mL をペトリ皿に一様に広がるように分注した後、水平に静置して凝固させる。更に、この上に培地 5 mL を一様に広がるように分注した後、水平に静置して凝固させる。以下、せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 水-アセトン-塩酸 (51+40+9)

B 試料溶液の調製

分析試料の一定量 (CTC として 64 µg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液 25 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水で pH を 4.4~4.6 に調整する。この液全量を 1 号緩衝液で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 1 号緩衝液を加えた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過し、0.32 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)
幼すう用配合飼料	5	6	93.2	4.5
ほ乳期子豚用配合飼料	5	6	98.5	3.9
ほ乳期子牛用配合飼料	5	6	96.5	5.4

・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
子牛用配合飼料	3	10	104.2	4.7	9.2

11.2.3 液体クロマトグラフ法

(適用範囲：飼料)

A 試薬の調製

- 1) 緩衝液 1号緩衝液
- 2) 抽出溶媒 1号緩衝液-メタノール-塩酸 (4 mol/L) (50+49+1)
- 3) クロルテトラサイクリン標準液 11.1.1のAの2)により1 mg(力価)/mLのクロルテトラサイクリン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL中にクロルテトラサイクリンとして、0.25~5.0 μg(力価)相当量を含有する数点のクロルテトラサイクリン標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 2~4 g (CTCとして0.2 mg(力価)相当量以下)を正確に量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒100 mLを加え、20分間かき混ぜて抽出する。抽出液を50 mLの共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×gで5分間遠心分離した後、上澄み液をメンブランフィルター(孔径0.5 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 試料溶液及び各クロルテトラサイクリン標準液 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：380 nm、蛍光波長：520 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：イミダゾール緩衝液^{注2}-メタノール(7+3)
 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又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のクロルテトラサイクリン量を算出する。

注1 YMC-Pack ODS-AM(ワイエムシィ製)又はこれと同等のもの

2 イミダゾール 68.08 g、酢酸マグネシウム四水和物 10.72 g及びエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 0.37 gを量って水 750 mLに溶かし、酢酸 25 mL程度を加えてpHを7.1~7.3に調整した後、更に水を加えて1,000 mL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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	10~30	3	93.4~104.1	7.5
ほ乳期子牛育成用配合飼料	10~30	3	95.3~99.6	6.2
若令牛育成用配合飼料	10~30	3	91.6~98.4	5.2

・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ほ乳期子牛用配合飼料	8	50	96.8	2.1	4.3	0.48

12 ケベマイシンナトリウム

12.1 定量試験法 (プレミックス)

12.1.1 平板法

A 試薬等の調製

1) 緩衝液

i) 7号緩衝液

ii) 10号緩衝液

2) ケベマイシン標準液 常用標準ケベマイシン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、7号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のケベマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を7号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

3) 培地 F-12号培地

使用に際して、メチレンブルー試液及びホウ酸溶液 (4 w/v%) を培地 100 mL に対してそれぞれ 1 mL 加える。

4) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 19637 を用い、 1×10^6 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。

5) 寒天平板 せん孔法による。

6) 抽出溶媒 メタノール-10号緩衝液 (7+3)

B 試料溶液の調製

1) 分析試料に SL 又は MN を含まない場合

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5種 A) でろ過する。

ろ液の一定量を7号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

2) 分析試料に SL 又は MN を含む場合

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶

媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液 25 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、塩酸で pH を 1.0 以下に調整した後 1 時間静置し、更にアンモニア水で pH を 6.9~7.1 に調整する。溶液全量を 50 mL の全量フラスコに移し、標線まで 7 号緩衝液を加えた後、ろ紙（5 種 A）でろ過する。ろ液の一定量を 7 号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

ただし、各寒天平板は、27~29 °C で 16~24 時間培養する。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ビタミンプレミックス	0.5~2	3	99.6~100.1	2.5
ビタミン・ミネラルプレミックス	0.5~2	3	99.0~100.1	1.8

13 サリノマイシンナトリウム

13.1 定量試験法（プレミックス）

13.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 希釈溶媒 水-メタノール (7+3)
- 2) サリノマイシン標準液 常用標準サリノマイシン適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で 3 時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のサリノマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、5 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 1.25 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 3) 培 地 F-16 号培地
- 4) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^8 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 円筒法による。
- 6) 抽出溶媒 メタノール-水 (9+1)

B 試料溶液の調製

- 1) 分析試料に OTC 又は CTC を含まない場合
分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。
ろ液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、5 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 1.25 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

2) 分析試料に OTC 又は CTC を含む場合

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液をカラム（カラム管（内径 14 mm）にカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（粒径 74~177 μm （200~80 メッシュ））12 g を乾式で充てんしたもの）に入れ、初めの流出液 5 mL を捨てる。

その後の流出液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、5 μg (力価)/mL の高濃度試料溶液及び 1.25 μg (力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ビタミンプレミックス	10~40	3	100.4~101.2	2.5
ビタミン・ミネラルプレミックス	10~40	3	99.3~99.8	1.1

13.1.2 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフによる定量試験法 第 3 節 1.1 による。

13.2 定量試験法（飼料）

13.2.1 平板法（その 1）

（適用範囲：鶏用）

A 試薬等の調製

- 1) 希釈溶媒 水-メタノール (7+3)
- 2) サリノマイシン標準液 13.1.1 の A の 2) により 1 mg(力価)/mL のサリノマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、3 μg (力価)/mL の高濃度標準液及び 0.75 μg (力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 3) 培 地 F-16 号培地
- 4) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 円筒法による。
- 6) 抽出溶媒 メタノール-水 (9+1)

B 試料溶液の調製

分析試料の一定量（SL として 0.5 mg(力価)相当量）を正確に量って 100 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 50 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液をカラム（カラム管（内径 14 mm）にカラムクロマトグラフ用塩基性ア

ルミナ（粒径 74~177 μm （200~80 メッシュ））12 g を乾式で充てんしたものに入れ、初めの流出液 5 mL を捨てる。

その後の流出液の一定量を水-メタノール（24+1）で正確に希釈して 3 μg （力価）/mL の高濃度試料溶液を調製し、更にこれを希釈溶媒で正確に希釈して 0.75 μg （力価）/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

（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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	37.5~62.5	6	98.9~99.4	1.4
中すう用配合飼料	37.5~62.5	6	98.5~98.9	1.7

- ・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _F (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
中すう用配合飼料	4	50	104.4	3.2	8.4

13.2.2 平板法（その2）

（適用範囲：牛用）

A 試薬等の調製

- 1) 希釈溶媒 水-メタノール（7+3）
- 2) サリノマイシン標準液 13.1.1 の A の 2)により 1 mg(力価)/mL のサリノマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、1.2 μg （力価）/mL の高濃度標準液及び 0.3 μg （力価）/mL の低濃度標準液を調製する。
- 3) 培 地 F-22 号培地
- 4) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 円筒法による。
- 6) 抽出溶媒 メタノール-水（9+1）

B 試料溶液の調製

分析試料の一定量（SL として 0.2 mg(力価)相当量）を正確に量って 100 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 50 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液をカラム（カラム管（内径 14 mm）にカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（粒径 74~177 μm （200~80 メッシュ））12 g を乾式で充てんしたもの）に入れ、初めの流出液 5 mL を捨てる。

その後の流出液の一定量を水-メタノール（24+1）で正確に希釈し、1.2 μg （力価）/mL の高濃度試料溶液を調製し、更にこれを希釈溶媒で正確に希釈し、0.3

μg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
牛用配合飼料1	10~30	3	97.9~111.0	14.1
牛用配合飼料2	10~30	3	100.6~107.4	4.9
牛用配合飼料3	10~30	3	100.8~105.1	4.8

13.2.3 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフによる定量試験法
第3節 1.2 による。

13.3 微量定量試験法 (飼料)

13.3.1 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる微量定量試験法
第3節 3 による。

13.3.2 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフ質量分析計による微量定量
試験法
第3節 4 による。

13.4 確認試験法 (プレミックス)

13.4.1 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる確認試験法
第3節 5.1 による。

13.5 確認試験法 (飼料)

13.5.1 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる確認試験法
第3節 5.2 による。

14 セデカマイシン

14.1 定量試験法 (プレミックス)

14.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 3号緩衝液
- 2) エステル分解酵素溶液 3.5 単位/mL のエステル分解酵素液^{注1} 5 mL を 50 mL の全量フラスコに入れ、標線まで水を加えた後、メンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過する。ろ液を水で正確に希釈し、0.035 単位/mL のエステル分解酵素溶液を調製する。
- 3) セデカマイシン標準液 常用標準セデカマイシン又はこれと同等のもの

40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のセデカマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を 3 号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

- 4) 培地 F-4 号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加えた後、更にエステル分解酵素溶液を培地 100 mL に対して 1 mL 加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトン 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液の一定量を 3 号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

注 1 セデカマイシン定量用エステル分解酵素液 (和光純薬工業製) 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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
子豚用プレミックス1	2.5~10	3	100.0~101.0	5.2
子豚用プレミックス2	2.5~10	3	96.7~102.3	8.3
ほ乳期子豚用プレミックス	2.5~10	3	96.0~103.3	4.9

- ・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
ほ乳期子豚用プレミックス	7	5	103.9	2.2	4.9

14.2 定量試験法 (飼料)

14.2.1 平板法 (その 1)

(適用範囲: ペレット状等加熱加工したものを除く飼料)

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 3 号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 3 号緩衝液-アセトン (3+1)
- 3) エステル分解酵素溶液 14.1.1 の A の 2)により 0.035 単位/mL のエステル分解酵素溶液を調製する。
- 4) セデカマイシン標準液 14.1.1 の A の 3)により 1 mg(力価)/mL のセデカマ

イシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、3.2 µg(力価)/mL、1.6 µg(力価)/mL、0.8 µg(力価)/mL、0.4 µg(力価)/mL 及び 0.2 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

- 5) 培地 F-4号培地
- 6) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、菌液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加えた後、更にエステル分解酵素溶液を培地 100 mL に対して 1 mL 加える。
- 7) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料 4~16 g (SCM として 80 µg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、酢酸エチル 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液 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。

ジクロロメタン 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 シリカゲルミニカラム (690 mg) をジクロロメタン 10 mL で洗浄する。

試料溶液をミニカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをジクロロメタン 2 mL で 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、圧注^{注1}して流出させる。ジクロロメタン-酢酸エチル (97+3) 20 mL をミニカラムに加え、ミニカラムを洗浄する。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、酢酸エチル 10 mL をミニカラムに加え、圧注^{注1}して SCM を溶出させる。

溶出液を 50 °C の水浴で減圧乾固した後、希釈溶媒 10 mL を正確に加え、振り混ぜて残留物を溶かし、0.8 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

注 1 流速は、約 2 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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ほ乳期子豚前期用配合飼料	5~20	3	99.4~105.5	3.4
ほ乳期子豚後期用配合飼料	5~20	3	100.2~107.8	8.7
子豚用配合飼料	5~20	3	96.3~101.8	5.3

- ・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
ほ乳期子豚後期用配合飼料	10	10	101.0	3.1	4.2

14.2.2 平板法（その2）

（適用範囲：ペレット状等加熱加工した飼料）

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 3号緩衝液
- 2) β -シクロデキストリン含有3号緩衝液 β -シクロデキストリン 1.2 g を3号緩衝液 1,000 mL に溶かした後、121 °C で15分間高圧蒸気滅菌する。
- 3) 希釈溶媒 β -シクロデキストリン含有3号緩衝液-メタノール (1+1)
- 4) エステル分解酵素溶液 14.1.1 のAの2)により0.035 単位/mL のエステル分解酵素溶液を調製する。
- 5) セデカマイシン標準液 14.1.1 のAの3)により1 mg(力価)/mL のセデカマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、3.2 μ g(力価)/mL、1.6 μ g(力価)/mL、0.8 μ g(力価)/mL、0.4 μ g(力価)/mL 及び0.2 μ g(力価)/mL の各標準液を調製する。
- 6) 培地 F-4号培地
- 7) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、菌液を培地 100 mL に対して0.2 mL 程度加えた後、更にエステル分解酵素溶液を培地 100 mL に対して1 mL 加える。
- 8) 寒天平板 せん孔法による。
- 9) 抽出溶媒 アセトニトリル-水 (4+1)

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料 4~16 g (SCM として 80 μ g(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液 10 mL を 200 mL の共栓三角フラスコに正確に入れ、水 90 mL を加えて振り混ぜ、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 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 (60 mg)^{注1} を2個連結し、メタノール 10 mL 及び水 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2}して流出させる。試料溶液の入っていた三角フラスコを水 5 mL で2回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、圧注^{注2}して流出させる。水 10 mL をミニカラムに加え、圧注^{注2}してミニカラムを洗浄する。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、メタノール 5 mL をミニカラムに加え、圧注して SCM を溶出させる。全量フラスコの標線まで β -シクロデキストリン含有3号緩衝液を加えて、0.8 μ g(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

注 1 Oasis HLB 3 cc (60 mg) Extraction 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 流速を 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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ほ乳期子豚用配合飼料	5~20	3	98.0~109.7	10.8
子豚用配合飼料	5~20	3	96.3~105.0	7.6

・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
ほ乳期子豚用配合飼料	8	10	98.8	2.8	5.6

15 センデュラマイシンナトリウム

15.1 定量試験法 (プレミックス)

15.1.1 平板法

(適用範囲：TP を含まないプレミックス)

A 試薬等の調製

- 1) 希釈溶媒 水-メタノール (7+3)
- 2) センデュラマイシン標準液 常用標準センデュラマイシン適量を減圧下 (0.67 kPa 以下) で、100 °C で 3 時間乾燥した後、その 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のセンデュラマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈して 2.5 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 1.25 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 3) 培地 F-15 号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^9 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 ジクロロメタン-2,2,4-トリメチルペンタン (1+1)

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液の一定量を抽出溶媒で 2~10 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 シリカゲルミニカラム (690 mg) をメタノール 5 mL 及びジクロロメタン 5 mL で順次洗浄する。

試料溶液の一定量 (SD として 0.1~0.5 mg(力価)相当量) をミニカラムに正確に入れ、そのミニカラムのリザーバー内の残量が 1 mL に達するまで自然流下させる。ジクロロメタン-アセトン (9+1) 20 mL 及びジクロロメタン-アセトン (4+1) 8 mL をミニカラムに正確に加え、順次流出させてミニカラムを

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、アセトン-メタノール (4+1) 10 mL をミニカラムに加えて SD を溶出させる。溶出液を 50 °C の水浴で減圧乾固し、希釈溶媒の一定量を正確に加えて残留物を溶かす。この液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈して 2.5 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 1.25 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
鶏用プレミックス1	0.4~10	3	100.7~103.7	7.0
鶏用プレミックス2	0.4~10	3	98.0~100.3	1.8
鶏用プレミックス3	0.4~10	3	98.3~101.0	1.7

・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
鶏用プレミックス	8	2	99.2	2.1	3.6

15.1.2 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフによる定量試験法
第3節 1.1 による。

15.2 定量試験法 (飼料)

15.2.1 平板法

(適用範囲: TP を含まない飼料)

A 試薬等の調製

- 1) 希釈溶媒 水-メタノール (7+3)
- 2) センデュラマイシン標準液 15.1.1 の A の 2) による。
- 3) 培 地 F-15 号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^9 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

抽 出 分析試料の一定量 (SD として 0.5 mg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、ジクロロメタン-2,2,4-トリメチルペンタン (1+1) 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 15 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 シリカゲルミニカラム (690 mg) をメタノール 5 mL 及びジクロ

ロメタン 5 mL で順次洗浄する。

試料溶液 25 mL をミニカラムに正確に入れ、そのミニカラムのリザーバー内の残量が 1 mL に達するまで自然流下させる。ジクロロメタン-アセトン (9+1) 20 mL 及びジクロロメタン-アセトン (4+1) 8 mL をミニカラムに正確に加え、順次流出させてミニカラムを洗浄する。

100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトン-メタノール (4+1) 10 mL をミニカラムに加えて SD を溶出させる。溶出液を 50 °C の水浴で減圧乾固し、希釈溶媒 25 mL を正確に加えて残留物を溶かす。この液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈して 2.5 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 1.25 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	25~50	3	99.3~107.0	11.0
プロイラー前期用配合飼料	25~50	3	97.7~105.0	3.4
プロイラー後期用配合飼料	25~50	3	98.3~99.7	8.5

- ・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
プロイラー後期用配合飼料	7	25	100.3	3.8	5.2

15.2.2 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフによる定量試験法
第3節 1.2 による。

15.3 微量定量試験法 (飼料)

15.3.1 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフ質量分析計による微量定量試験法

第3節 4 による。

15.4 確認試験法 (プレミックス)

15.4.1 バイオオートグラフ法

A 試薬等の調製

- 1) センデュラマイシン標準液 15.1.1 の A の 2) により 1 mg(力価)/mL のセンデュラマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、10 µg(力価)/mL の標準液を調製する。

- 2) 培 地 F-15 号培地

- 3) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^9 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 4) 抽出溶媒 ジクロロメタン-2,2,4-トリメチルペンタン (1+1)
- 5) 展開溶媒
 - i) 酢酸エチルーヘキサンーアセトンーメタノール (20+8+1+1)
 - ii) アセトニトリルー酢酸エチルーアセトン (2+1+1)
- 6) 発色試薬 3-(4-ヨードフェニル)-2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウムクロリド 100 mg を水に溶かして 200 mL とする。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液の一定量を抽出溶媒で 2~10 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 シリカゲルミニカラム (690 mg) をメタノール 5 mL 及びジクロロメタン 5 mL で順次洗浄する。

試料溶液の一定量 (SD として 0.1~0.5 mg(力価)相当量) をミニカラムに正確に入れ、そのミニカラムのリザーバー内の残量が 1 mL に達するまで自然流下させた後、ジクロロメタンーアセトン (9+1) 20 mL 及びジクロロメタンーアセトン (4+1) 8 mL をミニカラムに正確に加え、順次流出させてミニカラムを洗浄する。

100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトンーメタノール (4+1) 10 mL をミニカラムに加えて SD を溶出させる。溶出液を 50 °C の水浴で減圧乾固し、メタノールの一定量を正確に加えて残留物を溶かし、10 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 同 定

第 1 節 2 の C の薄層クロマトグラフィー、寒天平板の調製、培養及び同定の項による。

ただし、薄層板はシリカゲル薄層板^{注 1}を用い、標準液及び試料溶液各 100 µL をスポットし、展開溶媒の上達線が薄層板の上端に達するまで展開する。

注 1 TLC plate Silica gel 60 (20×20 cm) (Merck 製) 又はこれと同等のものを 110 °C で 2 時間乾燥して用いる。

15.5 確認試験法 (飼料)

15.5.1 バイオオートグラフ法

A 試薬等の調製

15.4.1 の A による。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料の一定量 (SD として 0.5 mg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、ジクロロメタン-2,2,4-トリメチルペンタン (1+1) 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の

共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 15 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 シリカゲルミニカラム (690 mg) をメタノール 5 mL 及びジクロロメタン 5 mL で順次洗浄する。

試料溶液 25 mL をミニカラムに正確に入れ、そのミニカラムのリザーバー内の残量が 1 mL に達するまで自然流下させる。ジクロロメタン-アセトン (9+1) 20 mL 及びジクロロメタン-アセトン (4+1) 8 mL をミニカラムに正確に加え、順次流出させてミニカラムを洗浄する。

100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトン-メタノール (4+1) 10 mL をミニカラムに加えて SD を溶出させる。溶出液を 50 °C の水浴で減圧乾固し、メタノールの一定量を正確に加えて残留物を溶かし、10 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 同 定

第 1 節 2 の C の薄層クロマトグラフィー、寒天平板の調製、培養及び同定の項による。

ただし、薄層板はシリカゲル薄層板^{注 1}を用い、標準液及び試料溶液各 100 µL をスポットし、展開溶媒の上達線が薄層板の上端に達するまで展開する。

注 1 TLC plate Silica gel 60 (20×20 cm) (Merck 製) 又はこれと同等のものを 110 °C で 2 時間乾燥して用いる。

16 チオペプチン

16.1 定量試験法 (プレミックス)

16.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 3号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 3号緩衝液-アセトン (7+3)
- 3) チオペプチン標準液 常用標準チオペプチン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、アセトン-水 (7+3) を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のチオペプチン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、0.5 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.125 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

- 4) 培 地 F-10 号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Corynebacterium xerosis* NCTC 9755 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 円筒法による。
- 7) 抽出溶媒 アセトン-水 (7+3)

B 試料溶液の調製

- 1) 分析試料に SL 又は MN を含まない場合
分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) で

ろ過する。

ろ液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、0.5 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び0.125 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

2) 分析試料に SL 又は MN を含む場合

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液 25 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、塩酸で pH を 1.0 以下に調整した後 1 時間静置し、更にアンモニア水で pH を 5.9~6.1 に調整する。この液全量を 3 号緩衝液-アセトン (7+3) で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで同溶媒を加えた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、0.5 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び0.125 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ビタミンプレミックス	0.5~2	3	96.9~97.6	1.8
ビタミン・ミネラルプレミックス	0.5~2	3	97.8~98.9	0.7

16.2 定量試験法 (飼料)

16.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 3 号緩衝液
- 2) チオペプチン標準液 16.1.1 の A の 3)により 1 mg(力価)/mL のチオペプチン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を 3 号緩衝液-アセトン (7+3) で正確に希釈し、0.2 µg(力価)/mL、0.1 µg(力価)/mL、0.05 µg(力価)/mL、0.025 µg(力価)/mL 及び 0.0125 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。
- 3) 培 地 F-112 号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Corynebacterium xerosis* NCTC 9755 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 アセトン-塩酸 (0.1 mol/L) (7+3)

B 試料溶液の調製

- 1) 分析試料に MN を含まない場合
分析試料 4~5 g (TP として 10~80 µg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過し、必要があれば、ろ液の一定量を抽出溶媒で正確に希釈し、0.1 µg(力価)/mL の試料原液とする。

試料原液 25 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水 (6 mol/L) で pH を 5.9~6.1 に調整する。この液全量を 3 号緩衝液で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 3 号緩衝液を加えた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過し、0.05 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

2) 分析試料に MN を含む場合

分析試料 4~5 g (TP として 10~80 µg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過し、必要があれば、ろ液の一定量を抽出溶媒で正確に希釈し、0.1 µg(力価)/mL の試料原液とする。

試料原液 25 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、塩酸で pH を 1.0 以下に調整した後 1 時間静置し、更にアンモニア水 (6 mol/L) で pH を 5.9~6.1 に調整する。この液全量を 3 号緩衝液で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 3 号緩衝液を加えた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過し、0.05 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	2~20	6	93.6~97.4	3.7
子豚用配合飼料	2~20	6	95.2~95.5	4.1

17 デストマイシン A

17.1 定量試験法 (飼料)

17.1.1 平板法

(適用範囲: OTC を含まない飼料)

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 4 号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 1 g を、4 号緩衝液に溶かして 1,000 mL とする。
- 3) デストマイシン A 標準液 常用標準デストマイシン A 又はこれと同等のもの適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で 3 時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、4 号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のデストマイシン A 標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、80 µg(力価)/mL、40 µg(力価)/mL、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL 及び 5 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

- 4) 培 地 F-3 号培地
- 5) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、

1×10⁷個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。

6) 寒天平板 せん孔法による。

7) イオン交換樹脂 イオン交換樹脂（弱酸性陽イオン交換）^{注1} 100 g を量って 1 L のビーカーに入れ、アンモニア水（1 mol/L）500 mL で洗浄した後、洗液を捨て、更にアンモニア水（1 mol/L）500 mL を加え、一夜静置する。次に、水で十分に洗浄して NH₄⁺型樹脂を調製する。

別に、イオン交換樹脂 100 g を量って 1 L のビーカーに入れ、塩酸（1 mol/L）500 mL で洗浄した後、洗液を捨て、更に塩酸（1 mol/L）500 mL を加え、一夜静置する。次に、水で十分に洗浄して H⁺型樹脂を調製する。

NH₄⁺型樹脂 70 mL 及び H⁺型樹脂 30 mL を十分にかき混ぜた後、水中に保存する。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料の一定量（DM-A として 0.2 mg(力価)相当量）を正確に量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、硫酸水素カリウム溶液（1 w/v%）200 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 200 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液全量を 200 mL のビーカーに入れ、アンモニア水で pH を 7.9~8.1 に調整する。更に、この液を 200 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 10 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙（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 イオン交換樹脂を水に懸濁させてカラム管（内径 10 mm）に 6 cm の高さまで流し込み、上部にガラスウールを軽く詰めた後、水 20 mL を加えて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 100 mL をカラムに入れ、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流速 2 mL/min で流出させる。更に水 40 mL をカラムに加えて、同様に流出させる。

200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、アンモニア水（1+49）40 mL をカラムに加えて DM-A を溶出させ、溶出液を 70 °C の水浴で減圧乾固した後、希釈溶媒 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、20 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

注 1 Amberlite CG-50 type-1（Rohm and Haas 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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ほ乳期子豚用配合飼料（2種） 及び子豚用配合飼料	5~10	3	99.3	6.6

・共同試験

試料の種類	試験室数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
子豚用配合飼料	6	8	97.0	5.6	6.6

18 ナラシン

18.1 定量試験法（プレミックス）

18.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 炭酸水素ナトリウム・メタノール溶液 炭酸水素ナトリウム 50 mg をメタノール 200 mL に溶かし、ろ紙（5種 A）でろ過する。
- 2) 希釈溶媒 水-メタノール（7+3）
- 3) ナラシン標準液 常用標準ナラシン 40 mg 以上を正確に量り、炭酸水素ナトリウム・メタノール溶液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のナラシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、2 μg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 μg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

- 4) 培地 F-22 号培地
- 5) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^9 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 円筒法による。
- 7) 抽出溶媒 メタノール-水（9+1）

B 試料溶液の調製

分析試料 2~4 g（NR として 240 mg(力価)相当量以下）を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5種 A）でろ過する。

ろ液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、2 μg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.5 μg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

（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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
鶏用プレミックス1	8~80	3	98.9~100.4	2.6
鶏用プレミックス2	8~80	3	98.1~101.4	2.5
鶏用プレミックス3	8~80	3	96.6~100.7	2.4

18.1.2 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフによる定量試験法
第3節 1.1 による。

18.2 定量試験法（飼料）

18.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 炭酸水素ナトリウム・メタノール溶液 炭酸水素ナトリウム 50 mg をメタノール 200 mL に溶かし、ろ紙（5種A）でろ過する。
- 2) 希釈溶媒 水-メタノール（7+3）
- 3) ナラシン標準液 18.1.1のAの3)による。
- 4) 培地 F-22号培地
- 5) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^9 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 円筒法による。
- 7) 抽出溶媒 メタノール-水（9+1）

B 試料溶液の調製

分析試料の一定量（NR として 0.8 mg(力価)相当量）を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5種A）でろ過する。

ろ液をカラム（カラム管（内径 14 mm）にカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（粒径 74~177 μm （200~80 メッシュ）12 g を乾式で充てんしたもの）に入れ、初めの流出液 5 mL を捨てる。

その後の流出液の一定量を水-メタノール（9+1）で正確に希釈し、2 μg (力価)/mL の高濃度試料溶液を調製し、これを更に希釈溶媒で正確に希釈し、0.5 μg (力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

（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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう育成用配合飼料	40~120	3	98.9~101.2	2.4
プロイラー肥育前期用配合飼料	40~120	3	99.5~101.7	3.4
プロイラー肥育後期用配合飼料	40~120	3	97.9~99.1	4.3

- ・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
幼すう育成用配合飼料	7	80	102.3	2.4	2.2

18.2.2 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフによる定量試験法
第3節 1.2 による。

18.3 微量定量試験法（飼料）

18.3.1 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフ質量分析計による微量定量試験法

第3節4による。

19 ノシヘプタイド

19.1 定量試験法（プレミックス）

19.1.1 平板法

（適用範囲：硫酸銅が 17 g/kg 以下のプレミックス）

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 4号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 4号緩衝液-アセトン (4+1)
- 3) ノシヘプタイド標準液 常用標準ノシヘプタイド適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で3時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、*N,N*-ジメチルホルムアミドを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のノシヘプタイド標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、0.1 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び0.025 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 4) 培地 F-7号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。
- 7) リン酸二水素カリウム溶液 リン酸二水素カリウム 52.5 g を水 1,000 mL に溶かし、水酸化ナトリウム飽和溶液で pH を 10.4~10.6 に調整する。
- 8) 抽出溶媒 *N,N*-ジメチルホルムアミド-リン酸二水素カリウム溶液 (7+3)

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物 2 g 及び抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 15 分間遠心分離する。上澄み液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈して 0.1 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.025 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
鶏用プレミックス1	0.4~10	3	93.3~98.7	3.4
鶏用プレミックス2	0.4~10	3	94.7~101.0	2.2
鶏用プレミックス3	0.4~10	3	93.3~99.3	2.1

・共同試験

試料の種類	試験室数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
鶏用プレミックス	8	2	99.9	1.9	5.8

19.2 定量試験法（飼料）

19.2.1 平板法

（適用範囲：ペレット状のもの、ほ乳期用のもの又はNHが5 g(力価)/t未満のものを除く飼料）

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 4号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 4号緩衝液－アセトン（4+1）
- 3) ノシヘプタイド標準液 19.1.1のAの3)により、1 mg(力価)/mLのノシヘプタイド標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、0.2 µg(力価)/mL、0.1 µg(力価)/mL、0.05 µg(力価)/mL、0.025 µg(力価)/mL及び0.0125 µg(力価)/mLの各ノシヘプタイド標準液を調製する。
- 4) 培地 F-7号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、100倍に希釈した菌液を培地100 mLに対して0.2 mL程度加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料10.0 gを量って200 mLの褐色共栓三角フラスコに入れ、4号緩衝液－アセトン（1+1）100 mLを加え、20分間かき混ぜて抽出し、抽出液をろ紙（5種A）でろ過する。ろ液10 mLを50 mLの褐色全量フラスコに正確に入れ、標線まで水を加え、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（トリファンクショナル）ミニカラム（400 mg）^{注1}のリザーバーをアルミ箔で覆い、ミニカラムをアセトン10 mL及び水10 mLで順次洗浄する。

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。水20 mLをミニカラムに加え、同様に圧注^{注2}して流出させる。

100 mLの褐色なす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトン10 mL及びアセトン－クロロホルム（1+1）20 mLを順次ミニカラムに加え、自然流下させてNHを溶出させる。溶出液を50 °Cの水浴で約1 mLまで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固させた後、希釈溶媒20 mLを正確に加えて残留物を溶かす。この液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、0.05 µg(力価)/mLの試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

注1 Sep-Pak Plus tC₁₈ Cartridge（Waters製）に適当な容量のリザーバーを連

結したものの又はこれと同等のもの

2 流速は、0.6~0.8 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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	5~20	3	94.7~103.7	8.9
プロイラー前期用配合飼料	5~20	3	93.0~95.7	5.8
子豚用配合飼料	5~20	3	94.7~100.7	8.3

・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
子豚用配合飼料	7	10	98.3	3.3	6.0

19.2.2 液体クロマトグラフ法

A 試薬の調製

- 1) 希釈溶媒 酢酸 (1+19) 250 mL をアセトン 750 mL に加えたもの
- 2) ノシヘプタイド標準液 常用標準ノシヘプタイド適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で 3 時間乾燥した後、20 mg(力価)相当量を正確に量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトン約 50 mL を加える。超音波処理してノシヘプタイドを溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてノシヘプタイド標準原液を調製する (この液 1 mL は、ノシヘプタイドとして 200 µg(力価)相当量を含む)。)

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にノシヘプタイドとして 2 ~ 0.025 µg(力価)相当量を含む数点のノシヘプタイド標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 5.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、酢酸 (1+19) 25 mL を加えて、10 分間かき混ぜる。更にアセトン 75 mL を加え、20 分間かき混ぜた後、10 分間超音波処理して抽出する。

抽出液の一定量を 5000×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 試料溶液及び各ノシヘプタイド標準液各 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：360 nm、蛍光波長：530 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：アセトニトリル-水-酢酸 (50+49+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、試料中のノシヘプタイド量を算出する。

注 1 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製、本測定条件によるノシヘプタイドの保持時間は約 7 分) 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(力価)/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	20.0	3	97.3	2.3
	10.0	3	94.2	1.8
	5.0	3	93.2	2.5
	2.5	3	94.3	1.6
ほ乳期子豚育成用 人工乳前期用 配合飼料	20.0	3	98.2	1.5
	10.0	3	97.7	2.4
ブロイラー肥育前期用 配合飼料	5.0	3	101	0.44
	2.5	3	92.7	2.1
ブロイラー肥育前期用 配合飼料	10.0	3	94.1	2.6
	5.0	3	93.7	1.7
	2.5	3	91.4	1.5

・ 共同試験

試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	有効 試験室数	棄却 試験室数	添加回収率 (%)	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	2.5	12	2	99.8	4.3	5.4	0.38
ほ乳期子豚育成用人工乳前期用配合飼料	5.0	11	3	98.4	2.7	2.7	0.21
ブロイラー肥育前期用配合飼料	10	13	1	102	3.1	3.8	0.34
子豚育成用配合飼料	20	13	1	101	2.3	2.9	0.28

19.3 微量定量試験法

19.3.1 バイオオートグラフ法

(適用範囲：飼料)

A 試薬等の調製

1) ノシヘプタイド標準液 19.1.1 の A の 3)により 1 mg(力価)/mL のノシヘプタイド標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、2 µg(力価)/mL、1 µg(力価)/mL、0.5 µg(力価)/mL、0.25 µg(力価)/mL 及び 0.125 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

2) 培 地 F-111 号培地

3) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、100 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。

4) 展開溶媒 クロロホルム-メタノール-アンモニア試液^{注1} (20+13+5)

5) 硫酸ナトリウム (無水) 110~120 °C で 2 時間乾燥し、デシケーターで放

冷する。

- 6) 発色試薬 3-(4-ヨードフェニル)-2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラ
ゾリウムクロリド 100 mg を水に溶かして 200 mL とする。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料 40.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセ
トニトリル 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5
種 A) でろ過する。ろ液 50 mL を 100 mL のなす形フラスコに入れ、50 °C の
水浴で減圧乾固した後、クロロホルム-酢酸エチル (9+1) 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 シリカゲルミニカラム (690 mg) をクロロホルム 10 mL で洗浄
する。

硫酸ナトリウム (無水) 約 40 g を入れた漏斗をミニカラムの上に置き、試
料溶液を漏斗に入れ、そのミニカラムのリザーバー内の残量が 1 mL に達する
まで自然流下させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをクロロホルム
-酢酸エチル (9+1) 10 mL で洗浄し、洗液を漏斗に加え、同様に 3 回操作す
る。

先の漏斗中の硫酸ナトリウムをクロロホルム-酢酸エチル (9+1) 10 mL で
洗浄し、洗液をミニカラムに加えた後、漏斗をとりはずし、クロロホルム-
酢酸エチル (9+1) 20 mL をミニカラムに加え、ミニカラムを洗浄する。

100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、クロロホルム-メタノ
ール (4+1) 30 mL をミニカラムに加えて NH を溶出させる。溶出液を 50 °C
の水浴で減圧乾固した後、メタノール 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、
試料溶液を調製する。

C 定 量

第 1 節 2 の C による。

ただし、展開溶媒は、展開槽に入れて 1 時間以上静置する。また、薄層板は、
シリカゲル薄層板^{註2}を用い、20~25 °C で原線より 150 mm まで展開する。

注 1 アンモニア水を水で希釈してアンモニア含量 17 % の溶液を調製する。

2 TLC plate Silica gel 60 (20×20 cm) (Merck 製) 又はこれと同等のものを
110 °C で 2 時間乾燥して用いる。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
成鶏用配合飼料	0.1~1	3	89.3~104.0	2.4
肉豚用配合飼料	0.1~1	3	94.7~102.7	8.8
乳牛用配合飼料	0.1~1	3	89.3~106.0	5.5

・共同試験

試料の種類	試験室数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
成鶏用配合飼料	11	1	108.5	6.2	8.7

19.3.2 液体クロマトグラフ法

A 試薬の調製

19.2.2 の A による。

B 定 量

19.2.2 の B 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(力価)/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	0.5	3	103	4.5
肉豚肥育用配合飼料	0.5	3	102	7.4
種豚飼育用配合飼料	0.5	3	98.9	7.8

・共同試験

試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	有効 試験室数	棄却 試験室数	添加回収率 (%)	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	0.5	14	0	108	8.1	13	0.75

・検出下限 試料中 0.5 g(力価)/t

20 ハイグロマイシン B

20.1 定量試験法 (飼料)

20.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 4号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 1 g を量り、4号緩衝液に溶かして 1,000 mL とする。
- 3) ハイグロマイシン B 標準液 常用標準ハイグロマイシン B 又はこれと同等のもの適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で 3 時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、4号緩衝液を正確に加えて溶かし、1,000 単位/mL のハイグロマイシン B 標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、80 単位/mL、40 単位/mL、20 単位/mL、10 単位/mL 及び 5 単位/mL の各標準液を調製する。
- 4) 培 地 F-3 号培地
- 5) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。
- 7) カラムクロマトグラフ用充てん剤
 - i) 合成吸着剤 合成吸着剤 (スチレンジビニルベンゼン共重合体) 注¹ 100

g を量って 1 L のビーカーに入れ、メタノール 500 mL で洗浄した後、洗液を捨て、更にメタノール 500 mL を加え、一夜静置する。次に、水で十分に洗浄し、水中に保存する。

- ii) イオン交換樹脂　イオン交換樹脂（弱酸性陽イオン交換）^{注2} 100 g を量って 1 L のビーカーに入れ、アンモニア水（1 mol/L）500 mL で洗浄した後、洗液を捨て、更にアンモニア水（1 mol/L）500 mL を加え、一夜静置する。次に、水で十分に洗浄して NH₄⁺型樹脂を調製する。

別に、イオン交換樹脂 100 g を量って 1 L のビーカーに入れ、塩酸（1 mol/L）500 mL で洗浄した後、洗液を捨て、更に塩酸（1 mol/L）500 mL を加え、一夜静置する。次に、水で十分に洗浄して H⁺型樹脂を調製する。

NH₄⁺型樹脂 70 mL 及び H⁺型樹脂 30 mL を十分にかき混ぜた後、水中に保存する。

B 試料溶液の調製

抽出　分析試料の一定量（HM-B として 200 単位相当量）を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、硫酸水素カリウム溶液（1 w/v%）200 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。

抽出液を 200 mL の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 150 mL を 200 mL のビーカーに入れ、水酸化ナトリウム溶液（10 mol/L）で pH を 7.9~8.1 に調整する。更にこの液を 200 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 10 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙（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　合成吸着剤を水に懸濁させて第 1 のカラム管（内径 10 mm）に 10 cm の高さまで流し込み、また、イオン交換樹脂を水に懸濁させて第 2 のカラム管（内径 10 mm）に 6 cm の高さまでそれぞれ流し込む。それぞれのカラム管について、ガラスウールを上部に軽く詰めた後、水 20 mL を加えて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。更に、第 1 のカラムの下端と第 2 のカラムの上端を気密に連結する。

試料溶液 100 mL をカラムに入れ、液面が第 1 のカラムの充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流速 2 mL/min で流出させる。更に水 40 mL をカラムに加え、液面が第 2 のカラムの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。

第 1 のカラムをとりはずし、100 mL のなす形フラスコを第 2 のカラムの下に置き、アンモニア水（1+24）25 mL を第 2 のカラムに加えて HM-B を溶出させる。溶出液を 70 °C の水浴で減圧乾固した後、希釈溶媒 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、20 単位/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

注 1 Amberlite XAD-2（Rohm and Haas 製）又はこれと同等のもの

2 Amberlite CG-50 type-1（Rohm and Haas 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 (万単位/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	660~1,320	3	91.6~102.6	12.2
子豚用配合飼料	660~1,320	3	92.9~99.3	11.2
ほ乳期子豚用配合飼料	660~1,320	3	94.8~98.3	10.3

・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (万単位/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
子豚育成用配合飼料	6	1,000	90.7	4.2	7.8

21 バージニアマイシン

21.1 定量試験法 (プレミックス)

21.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 2号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 2号緩衝液-アセトン (17+8) の pH を塩酸 (6 mol/L) で 5.9~6.1 に調整し、希釈溶媒とする。
- 3) バージニアマイシン標準液 常用標準バージニアマイシン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のバージニアマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 4) 培地 F-4 号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。
- 7) 抽出溶媒 アセトン-クエン酸一水和物溶液 (0.5 mol/L) (4+1)

B 試料溶液の調製

- 1) 分析試料に SL、MN 又は LS を含まない場合
分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出し、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。
ろ液 20 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水で pH を 5.9~6.1 に調整する。この液全量を 2号緩衝液で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 2号緩衝液を加えた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過する。
ろ液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

2) 分析試料に SL、MN 又は LS を含む場合

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出し、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液 20 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、塩酸で pH を 1.0 以下に調整した後 1 時間静置し、更にアンモニア水で pH を 5.9~6.1 に調整する。この液全量を 2 号緩衝液で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 2 号緩衝液を加えた後、ろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
プレミックス1	0.5~10	3	93.8~101.3	6.7
プレミックス2	0.5~10	3	97.4~103.6	5.7
プレミックス3	0.5~10	3	95.7~98.3	9.0
プレミックス4	0.5~10	3	96.2~108.5	5.1

・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
養豚用プレミックス	6	2	102.5	2.6	3.7

21.2 定量試験法（飼料）

21.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 緩衝液 2 号緩衝液
- バージニアマイシン標準液 21.1.1 の A の 3)により 1 mg(力価)/mL のバージニアマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を 2 号緩衝液-メタノール (7+3) で正確に希釈し、3.2 µg(力価)/mL、1.6 µg(力価)/mL、0.8 µg(力価)/mL、0.4 µg(力価)/mL 及び 0.2 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。
- 培 地 F-4 号培地
- 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、100 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

- VM が 10 g(力価)/t 以上の場合
分析試料の一定量 (VM として 0.16 mg(力価)相当量) を正確に量って 200

mL の共栓三角フラスコに入れ、ヘキサン 20 mL を加えて 10 分間静置した後、更にメタノール-2 号緩衝液 (1+1) 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、水-メタノール層 (下層) をろ紙 (6 種) でろ過する。

ろ液の一定量を 2 号緩衝液-メタノール (9+1) で正確に希釈し、0.8 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

2) VM が 10 g(力価)/t 未満の場合

分析試料の一定量 (VM として 40 µg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (6 種) でろ過する。

ろ液 20 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。ヘキサン 5 mL を加えて振り混ぜた後、メタノール 3 mL を正確に加えて残留物を溶かし、更に 2 号緩衝液 7 mL を正確に加えて振り混ぜる。この液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、水-メタノール層 (下層) を 0.8 µg(力価)/mL の試料溶液とする。

C 定 量

標準曲線法による。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	2~5	6	99.7~100.3	3.3
ブレイラー前期用配合飼料	2~5	6	98.0~99.7	2.0
ほ乳期子豚用配合飼料	10~20	6	100.6~101.2	1.4
子豚育成用配合飼料	10~20	6	100.9~101.4	2.1

・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
子豚用配合飼料	5	10	99.4	3.8	3.1

21.3 微量定量試験法

21.3.1 KT、VM 及び TS のバイオオートグラフによる微量定量試験法

(適用範囲：飼料)

第 3 節 2 による。

22 ビコザマイシン

22.1 定量試験法（プレミックス）

22.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 3号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 3号緩衝液 1,000 mL に対してクロロホルム 250 mL 程度を加えて振り混ぜ、緩衝液層（上層）を希釈溶媒とする。
- 3) ビコザマイシン標準液 常用標準ビコザマイシン 40 mg 以上を正確に量り、3号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のビコザマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、0.1 mg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.025 mg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 4) 培地 F-111号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Escherichia coli* ATCC 27166 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 円筒法による。
- 7) 抽出溶媒 クロロホルム-メタノール (1+1)

B 試料溶液の調製

分析試料の一定量（BZM として 0.01~0.1 g(力価)相当量）を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙（5種 A）でろ過する。

ろ液の一定量（BZM として 1 mg(力価)相当量）を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C の水浴で減圧乾固した後、クロロホルム 5 mL を加えて残留物を溶かす。更にこの液に 3号緩衝液 10 mL を正確に加えて振り混ぜた後、50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 10 分間遠心分離し、水層（上層）を 0.1 mg(力価)/mL の高濃度試料溶液とし、更にこれを希釈溶媒で正確に希釈し、25 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
プレミックス1	0.5~20	3	92.6~98.7	3.9
プレミックス2	0.5~20	3	98.8~101.9	4.9
プレミックス3	0.5~20	3	96.0~99.9	5.1

・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
養豚用プレミックス	8	2	95.9	2.1	2.8

22.2 定量試験法（飼料）

22.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 3号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 22.1.1のAの2)により調製する。
- 3) ビコザマイシン標準液 22.1.1のAの3)により1 mg(力価)/mLのビコザマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、12 μg(力価)/mL、6 μg(力価)/mL、3 μg(力価)/mL、1.5 μg(力価)/mL 及び 0.75 μg(力価)/mL の各標準液を調製する。
- 4) 培地 F-23号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Escherichia coli* BS-10 を用い、菌液を培地100 mL に対して1 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 円筒法による。
- 7) 抽出溶媒
 - i) 分析試料がペレット状等加熱加工した飼料以外の場合 クロロホルム-メタノール (1+1)
 - ii) 分析試料がペレット状等加熱加工した飼料の場合 クロロホルム-メタノール-水 (9+9+2)

B 試料溶液の調製

- 1) BZM が 10 g(力価)/t 以上の場合
分析試料の一定量（BZM として 0.2 mg(力価)相当量）を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙（5種 A）でろ過する。
ろ液 15 mL（BZM として 30 μg(力価)相当量）を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C の水浴で減圧乾固した後、クロロホルム 15 mL を加えて残留物を溶かす。更にこの液に 3 号緩衝液 10 mL を正確に加えて振り混ぜた後、50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 10 分間遠心分離し、水層（上層）を 3 μg(力価)/mL の試料溶液とする。
- 2) BZM が 10 g(力価)/t 未満の場合
分析試料の一定量（BZM として 0.1 mg(力価)相当量）を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙（5種 A）でろ過する。

ろ液 30 mL (BZM として 30 µg(力価)相当量) を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C の水浴で減圧乾固した後、クロロホルム 15 mL を加えて残留物を溶かす。更にこの液に 3 号緩衝液 10 mL を正確に加えて振り混ぜた後、50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 10 分間遠心分離し、水層 (上層) を 3 µg(力価)/mL の試料溶液とする。

C 定 量

標準曲線法による。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料 (非加熱)	5~10	6	98.9~99.9	4.4
プロイラー前期用配合飼料 (非加熱)	5~10	6	98.6~102.9	4.9
ほ乳期子豚用配合飼料 (非加熱)	5~10	6	99.8~106.0	4.3
ほ乳期子牛用配合飼料 (非加熱)	5~10	6	99.4~106.5	4.0

- ・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
幼すう用配合飼料 (非加熱)	5	10	103.6	3.6	5.0
幼すう用配合飼料 (加熱)	7	10	105.3	2.9	5.7

23 フラボフォスフォリポール

23.1 定量試験法 (プレミックス)

23.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 7号緩衝液
- 2) フラボフォスフォリポール標準液 常用標準フラボフォスフォリポール 40 mg 以上を正確に量り、メタノール-水 (1+1) を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のフラボフォスフォリポール標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を 7 号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 3) 培地 F-12 号培地
使用に際して、メチレンブルー試液及びホウ酸溶液 (4 w/v%) を培地 100 mL に対してそれぞれ 1 mL 加える。
- 4) 胞子液及び添加量 試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 19637 を用い、 1×10^6 個/mL の胞子液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

- 1) 分析試料に SL 又は MN を含まない場合
分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトン 50 mL を加え、20 分間かき混ぜ、更に水 50 mL を加え、20 分間かき混ぜて

抽出した後、抽出液をろ紙（5種A）でろ過する。

ろ液の一定量を7号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mLの高濃度試料溶液及び0.5 µg(力価)/mLの低濃度試料溶液を調製する。

2) 分析試料にSL又はMNを含む場合

分析試料3~5 gを正確に量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、アセトン50 mLを加え、20分間かき混ぜ、更に水50 mLを加え、20分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5種A）でろ過する。

ろ液25 mLを50 mLのビーカーに正確に入れ、塩酸でpHを1.0以下に調整した後1時間静置し、更にアンモニア水でpHを6.9~7.1に調整する。この液全量を7号緩衝液で50 mLの全量フラスコに移し、更に標線まで7号緩衝液を加えた後、ろ紙（5種A）でろ過する。

ろ液の一定量を7号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mLの高濃度試料溶液及び0.5 µg(力価)/mLの低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

ただし、各寒天平板は、27~29 °Cで16~24時間培養する。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ビタミンプレミックス	0.5~2	3	99.4~101.2	2.2
ビタミン・ミネラルプレミックス	0.5~2	3	99.0~100.2	1.8

24 ポリスチレンスルホン酸オレアンドマイシン

24.1 定量試験法（プレミックス）

24.1.1 平板法

A 試薬等の調製

1) 緩衝液

i) 4号緩衝液

ii) 9号緩衝液

2) オレアンドマイシン標準液 常用標準オレアンドマイシン又はこれと同等のもの40 mg以上を正確に量り、メタノール少量を正確に加えて溶かし、更に4号緩衝液を正確に加えて1 mg(力価)/mLのオレアンドマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を9号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mLの高濃度標準液及び0.5 µg(力価)/mLの低濃度標準液を調製する。

3) 培 地 F-7号培地

4) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、10倍に希釈した菌液を培地100 mLに対して0.8 mL程度加える。

5) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、9 号緩衝液 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液の一定量を 9 号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ビタミンプレミックス	0.5~2	3	100.5~100.7	1.1
ビタミン・ミネラルプレミックス	0.5~2	3	100.0~101.0	1.3

24.2 定量試験法（飼料）

24.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 9 号緩衝液
- 2) オレアンドマイシン標準液 24.1.1 の A の 2)により 1 mg(力価)/mL のオレアンドマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を 9 号緩衝液で正確に希釈し、0.8 µg(力価)/mL、0.4 µg(力価)/mL、0.2 µg(力価)/mL、0.1 µg(力価)/mL 及び 0.05 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。
- 3) 培 地 F-7 号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 メタノール-水 (1+1)

B 試料溶液の調製

- 1) OM が 10 g(力価)/t 以上の場合
分析試料の一定量（OM として 80 µg(力価)相当量）を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙（5 種 A）でろ過する。
ろ液 5 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C の水浴で減圧乾固した後、9 号緩衝液 20 mL を正確に加えて残留物を溶かし、0.2 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。
- 2) OM が 2 g(力価)/t 以上 10 g(力価)/t 未満の場合
分析試料の一定量（OM として 20 µg(力価)相当量）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、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液 10 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C の水浴で減圧乾固した後、9 号緩衝液 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、0.2 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

3) OM が 2 g(力価)/t 未満の場合

分析試料の一定量（OM として 8 µg(力価)相当量）を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液 20 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C の水浴で減圧乾固した後、9 号緩衝液 8 mL を正確に加えて残留物を溶かし、0.2 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	1~5	6	95.0~98.4	3.4
プロイラー前期用配合飼料	1~5	6	94.1~96.6	4.1
子豚用配合飼料	0.8~40	6	93.5~96.9	4.8

・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
幼すう用配合飼料	7	3	101.0	5.8	10.8

25 ポリナクチン

25.1 定量試験法（飼料）

25.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 4 号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイン酸エステル 2 mL を 4 号緩衝液—メタノール (4+1) 1,000 mL に溶かし、希釈溶媒とする。
- 3) ポリナクチン標準液 常用標準ポリナクチン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、アセトンを加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のポリナクチン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、1.6 µg(力価)/mL、0.8 µg(力価)/mL、0.4 µg(力価)/mL、0.2 µg(力価)/mL 及び 0.1 µg(力

価)/mL の各標準液を調製する。

- 4) 培地 F-5 号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Brevibacterium citreum* var. *polynactinus* を用い、菌液を培地 100 mL に対して 3 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。
ただし、菌液を添加した培地の分注量は 16 mL とし、せん孔後ペトリ皿のふたをとり、10~20 °C で 1 時間無菌状態の微風下に置いて培地表面を乾燥させる。
- 7) 抽出溶媒 ヘキサン飽和アセトニトリル

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料 8 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過し、精製に供する試料溶液とする。

精製 試料溶液 25 mL を 100 mL の共栓遠心沈殿管に正確に入れ、アセトニトリル飽和ヘキサン 25 mL を加えて 1 分間振り混ぜた後、1,500×g で 5 分間遠心分離する。アセトニトリル層 (下層) 20 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C の水浴で減圧乾固した後、クロロホルム 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 シリカゲルミニカラム (690 mg) をクロロホルム 10 mL で洗浄する。

硫酸ナトリウム (無水) 約 5 g を入れた漏斗をミニカラムの上に置き、試料溶液を漏斗に入れ、そのミニカラムのリザーバー内の残量が 1 mL に達するまで自然流下させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをクロロホルム 10 mL で洗浄し、洗液を漏斗に加え、同様に 2 回操作する。漏斗をとりはずし、クロロホルム-酢酸エチル (4+1) 10 mL をミニカラムに加え、ミニカラムを洗浄する。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、酢酸エチル-クロロホルム (4+1) 15 mL をミニカラムに加えて PN を溶出させる。溶出液を 40 °C の水浴で減圧乾固した後、希釈溶媒の一定量を正確に加えて残留物を溶かし、0.4 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

ただし、各寒天平板は、29~31 °C で 20~24 時間培養する。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	2.5~20	3	97.0~99.8	5.9
中すう用配合飼料	2.5~20	3	99.9~102.0	6.3
ブロイラー前期用配合飼料	2.5~20	3	94.1~103.4	10.3

・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
プロイラー前期用配合飼料	8	5	100.1	5.2	5.1

26 マカルボマイシン

26.1 定量試験法（プレミックス）

26.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 4号緩衝液
- 2) マカルボマイシン標準液 常用標準マカルボマイシン又はこれと同等のもの40 mg以上を正確に量り、水を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mLのマカルボマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を4号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mLの高濃度標準液及び0.5 µg(力価)/mLの低濃度標準液を調製する。
- 3) 培地 F-12号培地
使用に際して、メチレンブルー試液及びホウ酸溶液（4 w/v%）を培地100 mLに対してそれぞれ1 mL加える。
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 19637 を用い、 1×10^6 個/mLの孢子液を培地100 mLに対して0.2 mL程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

- 1) 分析試料にSL又はMNを含まない場合
分析試料3~5 gを正確に量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、アセトン50 mLを加え、20分間かき混ぜ、更に水50 mLを加え、20分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5種A）でろ過する。
ろ液の一定量を4号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mLの高濃度試料溶液及び0.5 µg(力価)/mLの低濃度試料溶液を調製する。
- 2) 分析試料にSL又はMNを含む場合
分析試料3~5 gを正確に量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、アセトン50 mLを加え、20分間かき混ぜ、更に水50 mLを加え、20分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5種A）でろ過する。
ろ液25 mLを50 mLのビーカーに正確に入れ、塩酸でpHを1.0以下に調整した後1時間静置し、更にアンモニア水でpHを7.9~8.1に調整する。この液全量を4号緩衝液で50 mLの全量フラスコに移し、更に標線まで4号緩衝液を加えた後、ろ紙（5種A）でろ過する。
ろ液の一定量を4号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mLの高濃度試料溶液及び0.5 µg(力価)/mLの低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

ただし、各寒天平板は、27~29 °C で 16~24 時間培養する。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ビタミンプレミックス	0.5~2	3	100.4~102.8	1.9
ビタミン・ミネラルプレミックス	0.5~2	3	100.1~101.9	1.9

26.2 定量試験法 (飼料)

26.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 4号緩衝液
- 2) マカルボマイシン標準液 26.1.1のAの2)により1 mg(力価)/mLのマカルボマイシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を4号緩衝液-アセトン-水(2+1+1)で正確に希釈し、0.4 µg(力価)/mL、0.2 µg(力価)/mL、0.1 µg(力価)/mL、0.05 µg(力価)/mL及び0.025 µg(力価)/mLの各標準液を調製する。
- 3) 培地 F-19号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 19637 を用い、 1×10^6 個/mLの孢子液を培地100 mLに対して0.2 mL程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 アセトン-水酸化ナトリウム溶液(0.01 mol/L) (1+1)

B 試料溶液の調製

分析試料5 gを正確に量って100 mLの共栓三角フラスコに入れ、ヘキサン10 mL及び抽出溶媒50 mLを加え、20分間かき混ぜて抽出した後、抽出液を50 mLの共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×gで5分間遠心分離する。水-アセトン層(下層)をろ紙(5種A)でろ過し、必要があれば、ろ液の一定量をアセトン-水(1+1)で正確に希釈し、0.2 µg(力価)/mLのろ液とする。

ろ液の一定量を4号緩衝液で正確に希釈し、0.1 µg(力価)/mLの試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

ただし、各寒天平板は、27~29 °C で 16~24 時間培養する。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	2~30	6	92.2~103.5	5.8
ブレイラー肥育前期用配合飼料	2~30	6	95.6~104.7	4.7
ほ乳期子豚育成用配合飼料	2~30	6	96.2~101.4	3.6
子豚育成用配合飼料	2~30	6	88.5~97.4	5.0

・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
プロイラー前期用配合飼料	5	10	103.5	5.4	10.6

27 モネンシンナトリウム

27.1 定量試験法（プレミックス）

27.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 希釈溶媒 水-メタノール (7+3)
- 2) モネンシン標準液 常用標準モネンシン 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のモネンシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、5 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 1.25 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 3) 培地 F-16 号培地
- 4) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^8 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 円筒法による。
- 6) 抽出溶媒 メタノール-水 (9+1)

B 試料溶液の調製

- 1) 分析試料に OTC 又は CTC を含まない場合
分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。
ろ液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、5 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 1.25 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。
- 2) 分析試料に OTC 又は CTC を含む場合
分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。
ろ液をカラム（カラム管（内径 14 mm）にカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（粒径 74~177 µm（200~80 メッシュ））12 g を乾式で充てんしたもの）に入れ、初めの流出液 5 mL を捨てる。
その後の流出液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、5 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 1.25 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ビタミンプレミックス	20~80	3	101.0~101.2	2.6
ビタミン・ミネラルプレミックス	20~80	3	99.4~100.8	2.4

27.1.2 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフによる定量試験法
第3節 1.1 による。

27.2 定量試験法 (飼料)

27.2.1 平板法 (その1)

(適用範囲: 鶏用飼料)

A 試薬等の調製

- 1) モネンシン標準液 27.1.1 の A の 2) により 1 mg(力価)/mL のモネンシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、4 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 1 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

- 2) 培地 F-16 号培地

- 3) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。

- 4) 寒天平板 円筒法による。

- 5) 抽出溶媒 メタノール-水 (9+1)

B 試料溶液の調製

分析試料の一定量 (MN として 0.8 mg(力価)相当量) を正確に量って 100 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 50 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液をカラム (カラム管 (内径 14 mm) にカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ (粒径 74~177 µm (200~80 メッシュ)) 12 g を乾式で充てんしたもの) に入れ、初めの流出液 5 mL を捨てる。

その後の流出液の一定量を水-メタノール (9+1) で正確に希釈し、4 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液を調製し、更にこれを水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、1 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	60~100	6	99.5~100.2	1.3
中すう用配合飼料	60~100	6	99.5~100.8	1.2

・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
中すう用配合飼料	4	80	100.1	2.0	2.9

27.2.2 平板法 (その2)

(適用範囲: 牛用飼料)

A 試薬等の調製

- 1) モネンシン標準液 27.1.1 の A の 2)により 1 mg(力価)/mL のモネンシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

- 2) 培地 F-22 号培地

- 3) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。

- 4) 寒天平板 円筒法による。

- 5) 抽出溶媒 メタノール-水 (9+1)

B 試料溶液の調製

分析試料の一定量 (MN として 0.3 mg(力価)相当量) を正確に量って 100 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 50 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液をカラム (カラム管 (内径 14 mm) にカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ (粒径 74~177 µm (200~80 メッシュ)) 12 g を乾式で充てんしたもの) に入れ、初めの流出液 5 mL を捨てる。

その後の流出液の一定量を水で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液を調製し、更にこれを水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ほ乳期子牛育成用配合飼料 1	15~45	3	98.6~105.1	5.9
ほ乳期子牛育成用配合飼料 2	15~45	3	101.7~103.9	3.2
ほ乳期子牛育成用配合飼料 3	15~45	3	102.0~105.0	5.3
ほ乳期子牛育成用配合飼料 4	15~45	3	103.5~105.9	8.3
ほ乳期子牛育成用配合飼料 5	15~45	3	91.7~99.6	4.3
肉用牛肥育用配合飼料1	15~45	3	101.6~108.7	4.5
肉用牛肥育用配合飼料2	15~45	3	102.3~110.8	10.4
肉用牛肥育用配合飼料3	15~45	3	105.9~110.9	5.5

27.2.3 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフによる定量試験法
第3節 1.2 による。

27.3 微量定量試験法

27.3.1 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる同時微量定量試験法
(適用範囲: 飼料)
第3節 3 による。

27.3.2 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフ質量分析計による微量定量
試験法
第3節 4 による。

27.4 確認試験法 (プレミックス)

27.4.1 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる確認試験法
第3節 5.1 による。

27.5 確認試験法 (飼料)

27.5.1 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる確認試験法
第3節 5.2 による。

28 ラサロシドナトリウム

28.1 定量試験法 (プレミックス)

28.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 希釈溶媒 水-メタノール (3+1)
- 2) ラサロシド標準液 常用標準ラサロシド 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のラサロシド標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、4 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 1 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

- 3) 培地 F-18号培地
- 4) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^9 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5種 A）でろ過する。

ろ液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、4 μg (力価)/mL の高濃度試料溶液及び 1 μg (力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
プレミックス1	7.5~75	6	95.6~99.3	1.6
プレミックス2	7.5~75	6	96.2~99.7	2.7
プレミックス3	7.5~75	6	93.3~98.8	3.0

- ・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
プロイラー用プレミックス	6	8	100.3	2.2	2.6
プロイラー用プレミックス	6	15	102.4	2.0	4.2

28.1.2 液体クロマトグラフ法

A 試薬の調製

ラサロシドナトリウム標準液 常用標準ラサロシド 50 mg(力価)相当量を正確に量って 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ラサロシドナトリウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、ラサロシドナトリウムとして 0.5 mg(力価)相当量を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にラサロシドナトリウムとして 1~15 μg (力価)相当量を含有する数点のラサロシドナトリウム標準液を調製する。

B 定 量

抽出 試料 2~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500 \times g で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一定量をメタノールで正確に希釈する。更に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 試料溶液及び各ラサロシドナトリウム標準液各 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：蛍光検出器（励起波長：310 nm、蛍光波長：420 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：メタノールーリン酸緩衝液^{注2}（9+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高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のラサロシドナトリウム量を算出する。

注 1 Shodex シリカ C18M 4E（昭和電工製）又はこれと同等のもの

2 リン酸二水素カリウム 2.72 g を水に溶かして 1 L とし、リン酸（1+10）で pH を 2.9~3.1 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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
鶏用プレミックス1	18.25~75	3	98.5~101.5	1.2
鶏用プレミックス2	18.25~75	3	95.8~100.1	2.6
牛用プレミックス	18.25~75	3	98.2~100.8	1.4

28.2 定量試験法（飼料）

28.2.1 平板法（その1）

（適用範囲：鶏用）

A 試薬等の調製

- 1) ラサロシド標準液 28.1.1 の A の 2)により 1 mg(力価)/mL のラサロシド標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を水ーメタノール（3+1）で正確に希釈し、1 μg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 μg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 2) 培 地 F-18 号培地
- 3) 胞子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^7 個/mL の胞子液を培地 100 mL に対して 0.4 mL 程度加える。
- 4) 寒天平板 せん孔法による。
- 5) シリカゲル カラムクロマトグラフ用シリカゲル^{注1}（粒径 63~200 μm（230~70 メッシュ））を 110 °C で 2 時間乾燥する。

B 試料溶液の調製

抽 出 分析試料の一定量（LS として 1 mg(力価)相当量）を正確に量って 200 mL の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した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。ろ液 25 mL を 50 mL の共栓試験管に入れ、硫酸ナトリウム（無水）で脱水した後、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 シリカゲル 2.5 g をメタノールに懸濁させてカラム管（内径 10 mm）に流し込み、メタノール 20 mL 及びクロロホルム 50 mL で順次洗浄してカラムを調製する。

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速 2~3 mL/min で流出させた後、クロロホルム 30 mL を加え、同様に流出させる。

50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、メタノール 15 mL をカラムに加えて LS を溶出させ、溶出液を 50 °C の水浴で減圧乾固した後、メタノール 5 mL を正確に加えて残留物を溶かす。この液の一定量を水-メタノール（5+1）で正確に希釈し、1 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液を調製し、更にこれを水-メタノール（3+1）で正確に希釈し、0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

注 1 Silica gel 40 (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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼おう育成用配合飼料	75~125	6	99.3~102.3	2.1
プロイラー後期用配合飼料	75~125	6	98.3~100.7	3.6

- ・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
プロイラー用配合飼料	7	75	100.8	2.7	5.6

28.2.2 平板法（その 2）

（適用範囲：牛用）

A 試薬等の調製

- 1) ラサロシド標準液 28.1.1 の A の 2) により 1 mg(力価)/mL のラサロシド標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を水-メタノール（3+1）で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 1 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

- 2) 培 地 F-18 号培地
- 3) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.4 mL 程度加える。
- 4) 寒天平板 せん孔法による。
- 5) 酵素溶液 ジアスターゼ 4 g を水に溶解し、100 mL とする。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料 18.2 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、酵素溶液 15 mL を加えてかき混ぜた後、10~20 分間室温で静置する。更にアセトニトリル 85 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過して精製に供する試料溶液とする。

精製 試料溶液 25 mL を 200 mL の分液漏斗に正確に入れ、水 25 mL を加え、更にヘキサン 50 mL を加えて 10 分間振り混ぜた後静置する。ヘキサン層（上層）を 200 mL のなす形フラスコに入れ、残留液にヘキサン 50 mL を加えて 1 分間振り混ぜ、ヘキサン層を先のなす形フラスコに合わせる。更に残留液にヘキサン 50 mL を加えて同様に操作する。ヘキサン層を 50 °C の水浴で減圧乾固した後、ヘキサン 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 シリカゲルミニカラム（690 mg）をヘキサン 10 mL で洗浄する。

試料溶液をミニカラムに入れ、そのミニカラムのリザーバー内の残量が 1 mL に達するまで自然流下させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 10 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加え、同様に 2 回操作する。次に、ヘキサン 20 mL 及びクロロホルム 20 mL をミニカラムに加え、ミニカラムを順次洗浄する。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、クロロホルム-メタノール（4+1）30 mL をミニカラムに加えて LS を溶出させる。溶出液を 50 °C の水浴で減圧乾固した後、メタノール 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、この液をろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液の一定量を水-メタノール（45+7）で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液を調製し、更にこれを水-メタノール（3+1）で正確に希釈し、1 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

（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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
肉用牛肥育用配合飼料1	33	3	100.8~100.8	0.9
肉用牛肥育用配合飼料2	33	3	98.9~98.9	3.5

- ・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
肉用牛肥育用配合飼料	11	33	95.7	3.5	6.0

28.2.3 液体クロマトグラフ法

（適用範囲：鶏用）

A 試薬の調製

- 1) ラサロシドナトリウム標準液 28.1.2 の A による。
- 2) 酵素溶液 ジアスターゼ 2.5 g を水に溶かして 100 mL とする。

B 定 量

抽 出

- 1) 分析試料がペレット状等加熱加工した飼料の場合

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、酵素溶液 20 mL を加え、よく混和した後、40 °C の水浴上で 20 分間静置する。更にメタノール 80 mL をこの液に加え、10 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の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。

- 2) 分析試料がペレット状等加熱加工した飼料以外の場合

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の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 28.1.2 の B の液体クロマトグラフィーの項による。

計 算 28.1.2 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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう育成用配合飼料1 (非加熱)	37.5~112.5	3	97.3~99.7	5.2
幼すう育成用配合飼料2 (非加熱)	37.5~112.5	3	95.6~100.4	5.5
ブローラー肥育前期用配合飼料 (非加熱)	37.5~112.5	3	98.8~103.2	4.9
幼すう育成用配合飼料 (加熱)	37.5~112.5	3	104.4~107.4	4.0

- ・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
幼すう育成用配合飼料 (非加熱)	6	75	96.9	1.6	2.1
幼すう育成用配合飼料 (加熱)	6	75	106.3	1.7	4.0

28.3 微量定量試験法

28.3.1 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる微量定量試験法

(適用範囲：飼料)

第 3 節 3 による。

28.3.2 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフ質量分析計による微量定量試験法

第3節4による。

28.4 確認試験法（プレミックス）

28.4.1 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる確認試験法

第3節5.1による。

28.5 確認試験法（飼料）

28.5.1 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる確認試験法

第3節5.2による。

29 硫酸カナマイシン

29.1 定量試験法（プレミックス）

29.1.1 平板法

A 試薬等の調製

1) 緩衝液

i) 2号緩衝液

ii) 4号緩衝液

2) カナマイシン標準液 常用標準カナマイシン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、2号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のカナマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を4号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

3) 培地 F-3号培地

4) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^5 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。

5) 寒天平板 せん孔法による。

6) 抽出溶媒 水-アセトン-塩酸 (51+40+9)

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5種 A）でろ過する。ろ液 20 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水で pH を 7.9~8.1 に調整する。この液全量を 4号緩衝液で 100 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 4号緩衝液を加えた後、ろ紙（5種 A）でろ過する。

ろ液の一定量を 4号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ビタミンプレミックス	2~10	3	98.8~100.6	2.2
ビタミン・ミネラルプレミックス	2~10	3	98.5~100.5	1.6

30 硫酸コリスチン

30.1 定量試験法 (プレミックス)

30.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 5号緩衝液
- 2) コリスチン標準液 常用標準コリスチン又はこれと同等のもの適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で3時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、5号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のコリスチン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を5号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 3) 培地 F-9号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617 を用い、菌液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、塩酸 (1 mol/L) 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5種 A) でろ過する。ろ液 20 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水で pH を 5.9~6.1 に調整する。この液全量を 5号緩衝液で 100 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 5号緩衝液を加えた後、ろ紙 (5種 A) でろ過する。

ろ液の一定量を 5号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
プレミックス1	0.5~10	3	96.4~101.9	3.3
プレミックス2	0.5~10	3	96.7~104.5	4.7
プレミックス3	0.5~10	3	95.6~99.9	5.1

・共同試験

試料の種類	試験室数	添加濃度 (g(力価)/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
プレミックス	6	2	95.1	3.6	4.3

30.2 定量試験法（飼料）

30.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 5号緩衝液
- 2) 希釈溶媒
 - i) CLが10 g(力価)/t 以上の場合 5号緩衝液－アセトン－ピリジン (91+8+1)
 - ii) CLが10 g(力価)/t 未満の場合 5号緩衝液－アセトン－ピリジン (83+15+2)
- 3) コリスチン標準液 30.1.1のAの2)により1 mg(力価)/mLのコリスチン標準原液を調製する。
 使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、0.8 μg(力価)/mL、0.4 μg(力価)/mL、0.2 μg(力価)/mL、0.1 μg(力価)/mL 及び 0.05 μg(力価)/mL の各標準液を調製する。
- 4) 培地 F-9号培地
- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617 を用い、100倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。
- 6) 寒天平板 せん孔法による。
- 7) 抽出溶媒 水－アセトン－塩酸 (51+40+9)

B 試料溶液の調製

- 1) CLが10 g(力価)/t 以上の場合
 分析試料の一定量（CLとして0.1 mg(力価)相当量）を正確に量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、ピリジン 5 mL 及びヘキサン 5 mL を加え、2~3分間かき混ぜる。更に抽出溶媒 95 mL を加え、20分間かき混ぜて抽出する。抽出液を50 mLの共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×gで5分間遠心分離した後、水－アセトン層（下層）をろ紙（5種A）でろ過する。
 ろ液 20 mL を50 mLのビーカーに正確に入れ、アンモニア水でpHを5.9~6.1に調整する。この液全量を5号緩衝液で100 mLの全量フラスコに移し、更に標線まで5号緩衝液を加えた後、ろ紙（5種A）でろ過し、0.2 μg(力価)/mLの試料溶液を調製する。
- 2) CLが10 g(力価)/t 未満の場合
 分析試料の一定量（CLとして50 μg(力価)相当量）を正確に量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、ピリジン 5 mL 及びヘキサン 5 mL を加え、2~3分間かき混ぜる。更に抽出溶媒 95 mL を加え、20分間かき混ぜて抽出する。抽出液を50 mLの共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×gで5分間遠心分離し、水－

アセトン層（下層）をろ紙（5種A）でろ過する。

ろ液 20 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水で pH を 5.9~6.1 に調整する。この液全量を 5 号緩衝液で 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 5 号緩衝液を加えた後、ろ紙（5種A）でろ過し、0.2 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

添加成分	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
硫酸コリスチン (精製級)	幼すう育成用配合飼料	2~40	3	98.2~99.2	3.5
	中すう育成用配合飼料	2~40	3	100.2~100.5	2.5
	大すう育成用配合飼料	2~40	3	97.8~101.8	2.8
	子豚育成用配合飼料	2~40	3	98.5~100.4	2.3
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	2~40	3	98.1~99.6	2.0
硫酸コリスチン (飼料級)	ほ乳期子豚育成用配合飼料	2~40	4	98.3~100.2	2.2
	幼すう育成用配合飼料	2~40	3	98.1~99.2	3.5
	中すう育成用配合飼料	2~40	3	98.1~99.7	3.5
	大すう育成用配合飼料	2~40	3	97.2~99.4	2.4
	子豚育成用配合飼料	2~40	3	98.0~99.1	2.4

・ 共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
幼すう用配合飼料	4	10	105.2	6.9	6.3

31 硫酸フラジオマイシン

31.1 定量試験法（プレミックス）

31.1.1 平板法

A 試薬等の調製

1) 緩衝液

i) 4号緩衝液

ii) 6号緩衝液

2) フラジオマイシン標準液 常用標準フラジオマイシン又はこれと同等のもの適量を減圧下（0.67 kPa 以下）、60 °C で3時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、6号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のフラジオマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を4号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

3) 培地 F-24号培地

4) 胞子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、

1×10⁷個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。

- 5) 寒天平板 せん孔法による。
- 6) 抽出溶媒 水-アセトン-塩酸 (51+40+9)

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液 20 mL を 50 mL のビーカーに正確に入れ、アンモニア水で pH を 7.9~8.1 に調整する。この液全量を 4 号緩衝液で 100 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで 4 号緩衝液を加えた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液の一定量を 4 号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ビタミンプレミックス	2~10	3	99.7~101.0	2.1
ビタミン・ミネラルプレミックス	2~10	3	98.6~100.6	1.9

32 リン酸タイロシン

32.1 定量試験法 (プレミックス)

32.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 4 号緩衝液
- 2) タイロシン標準液 常用標準タイロシン適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で 3 時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、メタノール少量を正確に加えて溶かし、更に 4 号緩衝液を正確に加えて 1 mg(力価)/mL のタイロシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量を 4 号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。

- 3) 培 地 F-7 号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 50 mL を加え、20 分間かき混ぜ、更にメタノール 50 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液の一定量を 4 号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度試料溶液

及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(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(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ビタミンプレミックス	2~10	3	98.2~99.9	0.7
ビタミン・ミネラルプレミックス	2~10	3	96.8~99.5	0.9

32.2 定量試験法 (飼料)

32.2.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 4号緩衝液
- 2) タイロシン標準液 32.1.1のAの2)により1 mg(力価)/mLのタイロシン標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を4号緩衝液-メタノール(4+1)で正確に希釈し、3.2 µg(力価)/mL、1.6 µg(力価)/mL、0.8 µg(力価)/mL、0.4 µg(力価)/mL及び0.2 µg(力価)/mLの各標準液を調製する。
- 3) 培地 F-7号培地
- 4) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、100倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

- 1) TS が 40 g(力価)/t 以上の場合
分析試料の一定量 (TS として 0.4 mg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 50 mL を加え、20 分間かき混ぜる。更にメタノール 50 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。
ろ液の一定量を 4 号緩衝液-メタノール (7+1) で正確に希釈し、0.8 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。
- 2) TS が 10 g(力価)/t 以上 40 g(力価)/t 未満の場合
分析試料の一定量 (TS として 0.2 mg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 50 mL を加え、20 分間かき混ぜる。更にメタノール 50 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。
ろ液の一定量を 4 号緩衝液で正確に希釈し、0.8 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。
- 3) TS が 10 g(力価)/t 未満の場合
分析試料の一定量 (TS として 80 µg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL

の共栓三角フラスコに入れ、水 50 mL を加え、20 分間かき混ぜる。更にメタノール 50 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液 20 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C の水浴で減圧乾固した後、水 8 mL を正確に加えて残留物を溶かす。更に、4 号緩衝液－メタノール（2+1）12 mL をこの液に正確に加えて振り混ぜ、0.8 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 定 量

標準曲線法による。

(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(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼すう用配合飼料	4.4~22	6	98.7~100.7	2.7
中すう用配合飼料	4.4~22	6	99.3~101.1	2.8
ほ乳期子豚用配合飼料	4.4~22	6	99.7~100.4	1.6

- ・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)
ほ乳期子豚用配合飼料	5	88	101.2	4.8	5.2

32.3 微量定量試験法

32.3.1 KT、VM 及び TS のバイオオートグラフによる微量定量試験法

(適用範囲：飼料)

第 3 節 2 による。

32.4 確認試験法（プレミックス）

32.4.1 バイオオートグラフ法

A 試薬等の調製

- 1) タイロシン標準液 32.1.1 の(1)の A の 2)により 1 mg(力価)/mL のタイロシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、10 µg(力価)/mL の濃度に調製した後、アンモニア水（25 %）を等量加えて 5 µg(力価)/mL のタイロシン標準液を調製する。

- 2) 培 地 F-111 号培地
- 3) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.1 % 程度加える。
- 4) 展開溶媒 アセトニトリル－メタノール（17+3）
- 5) 発色液 2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウムクロリド 100 mg を水に溶かして 200 mL とする。

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 50 mL を加え、20 分間かき混ぜ、更にメタノール 50 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液の一定量をメタノールで希釈し、10 µg(力価)/mL の濃度に調製した後、アンモニア水（25 %）を等量加えて 5 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 同 定

第 1 節 2 の C の薄層クロマトグラフィー、寒天平板の調製、培養及び同定の項による。

ただし、薄層板はシリカゲル薄層板^{注 1}を用い、展開溶媒の上達線が薄層板の上端に達するまで展開する。

注 1 TLC plate Silica gel 60 (20×20 cm) (Merck 製) 又はこれと同等のもの

32.5 確認試験法（飼料）

32.5.1 バイオオートグラフ法

A 試薬等の調製

1) タイロシン標準液 32.1.1 の A の 2)により 1 mg(力価)/mL のタイロシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、10 µg(力価)/mL の濃度に調製した後、アンモニア水（25 %）を等量加えて 5 µg(力価)/mL のタイロシン標準液を調製する。

2) 培 地 F-111 号培地

3) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、10 倍に希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.1 % 程度加える。

4) 展開溶媒 アセトニトリル-メタノール（17+3）

5) 発色液 2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウムクロリド 100 mg を水に溶かして 200 mL とする。

B 試料溶液の調製

分析試料の一定量（TS として 0.4 mg(力価)相当量）を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過し、ろ液にアンモニア水（25 %）を等量加えて 2 µg(力価)/mL の試料溶液とする。

C 同 定

32.4.1 の C による。

ただし、標準液及び試料溶液各 50 µL をスポットする。

第3節 多成分分析法

1 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフによる定量試験法

1.1 プレミックス

- (1) 分析対象抗生物質 SL、SD、NR 及び MN
- (2) 分析法

A 試薬の調製

- 1) サリノマイシンナトリウム標準液 常用標準サリノマイシン適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で3時間乾燥し、20 mg(力価)相当量を正確に量って 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サリノマイシンナトリウム標準原液を調製する (この液 1 mL は、サリノマイシンナトリウムとして 0.2 mg(力価)相当量を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中にサリノマイシンナトリウムとして 2.5~20 µg(力価)相当量を含有する数点のサリノマイシンナトリウム標準液を調製する。

- 2) センデュラマイシンナトリウム標準液 常用標準センデュラマイシン 20 mg(力価)相当量を正確に量って 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標準原液を調製する (この液 1 mL は、センデュラマイシンナトリウムとして 0.2 mg(力価)相当量を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にセンデュラマイシンナトリウムとして 2.5~20 µg(力価)相当量を含有する数点のセンデュラマイシンナトリウム標準液を調製する。

- 3) ナラシン標準液 常用標準ナラシン 20 mg(力価)相当量を正確に量って 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ナラシン標準原液を調製する (この液 1 mL は、ナラシンとして 0.2 mg(力価)相当量を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中にナラシンとして 0.5~20 µg(力価)相当量を含有する数点のナラシン標準液を調製する。

- 4) モネンシンナトリウム標準液 常用標準モネンシン 20 mg(力価)相当量を正確に量って 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モネンシンナトリウム標準原液を調製する (この液 1 mL は、モネンシンナトリウムとして 0.2 mg(力価)相当量を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中にモネンシンナトリウムとして 2.5~20 µg(力価)相当量を含有する数点のモネンシンナトリウム標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 2~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水 (9+1) 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出し、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に

希釈した後、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 試料溶液及び各抗生物質標準液各 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：紫外可視吸光光度検出器（測定波長：520 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1}

溶離液：メタノール-水-酢酸（940+60+1）

反応液^{注2}：硫酸 10 mL をメタノール 475 mL にかき混ぜながら徐々に加えた後、バニリン 15 g を加えて溶かす（用時調製する。）。

流速：溶離液 0.6 mL/min、反応液 0.6 mL/min

反応槽温度：95 $^{\circ}\text{C}$

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、試料中の各抗生物質量^{注3,4}を算出する。

注 1 Mightysil RP-18 GP（関東化学製）又はこれと同等のもの

2 反応槽内の反応コイル（内径 0.5 mm、長さ 5 m（SD の感度が不足する場合には 10 m とする。））、ステンレス製）中で反応液をカラムから溶出した溶離液に合わせて発色させた後、直ちに紫外可視吸光光度検出器に送る。反応液は、遮光容器に入れて使用すること。

3 モネンシンナトリウムについては、算出したモネンシン A 量をモネンシンナトリウム量とする。なお、各モネンシンナトリウム標準液のクロマトグラムに現れる主要なピークが、モネンシン A である。また、試料溶液のクロマトグラムにおいては、標準液のモネンシン A と同じ保持時間に現れるピークがモネンシン A である。

4 ナラシンについては、算出したナラシン A 量をナラシン量とする。なお、各ナラシン標準液のクロマトグラムに現れる主要なピークが、ナラシン A である。また、試料溶液のクロマトグラムにおいては、標準液のナラシン A と同じ保持時間に現れるピークがナラシン A である。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/kg)	繰返 し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
サリノマ イシンナ トリウム	幼すう育成用プレミックス	12.5~85.0	3	99.3~102.1	3.8
	プロイラー肥育後期用プレミックス	12.5~85.0	3	96.3~102.7	3.0
	肉用牛肥育用プレミックス	12.5~85.0	3	98.0~100.8	2.8
センデュ ラマイシ ンナトリ ウム	鶏用プレミックス1	8~42	3	99.8~101.8	2.4
	鶏用プレミックス2	8~42	3	98.5~102.4	2.8
	鶏用プレミックス3	8~42	3	98.2~100.7	2.7
ナラシン	鶏用プレミックス1	8~80	3	98.7~103.8	0.9
	鶏用プレミックス2	8~80	3	96.0~99.4	0.8
	鶏用プレミックス3	8~80	3	96.6~99.8	0.5
モネンシ ンナトリ ウム	幼すう育成用プレミックス	5~80	3	98.2~102.4	2.1
	プロイラー肥育後期用プレミックス	5~80	3	101.4~102.5	2.0
	肉用牛肥育用プレミックス	5~80	3	96.6~99.5	4.7

1.2 飼料

(1) 分析対象抗生物質 SL、SD、NR 及び MN

(2) 分析法

A 試薬の調製

1) サリノマイシンナトリウム標準液 1.1 の A によりサリノマイシンナトリウム標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中にサリノマイシンナトリウムとして 0.5~8 µg(力価)相当量を含む数点のサリノマイシンナトリウム標準液を調製する。

2) センデュラマイシンナトリウム標準液 1.1 の A によりセンデュラマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にセンデュラマイシンナトリウムとして 0.5~10 µg(力価)相当量を含む各センデュラマイシンナトリウム標準液を調製する。

3) ナラシン標準液 1.1 の A による。

4) モネンシンナトリウム標準液 1.1 の A によりモネンシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中にモネンシンナトリウムとして 0.5~15 µg(力価)相当量を含む数点のモネンシンナトリウム標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水 (9+1) 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出し、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ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 の B の液体クロマトグラフィーの項による。

計 算 1.1 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

添加成分	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
サリノマイ シンナトリ ウム	幼すう 育成用配合飼料	25~75	3	96.7~101.7	4.6
	ブロイラー 肥育前期用配合飼料	25~75	3	96.0~ 98.7	2.1
	ブロイラー 肥育後期用配合飼料	25~75	3	97.7~101.3	4.0
	幼令牛 育成用配合飼料	7.5~22.5	3	97.0~100.7	4.6
	肉用牛 肥育前期用配合飼料	7.5~22.5	3	98.3~103.3	4.6
	肉用牛 肥育後期用配合飼料	7.5~22.5	3	97.7~103.0	4.0
センデュ ラマイシ ン	幼すう 育成用配合飼料	12.5~37.5	3	95.6~97.8	1.3
	ブロイラー 肥育前期用配合飼料	12.5~37.5	3	97.5~98.7	1.9
	ブロイラー 肥育後期用配合飼料	12.5~37.5	3	97.7~98.3	1.5
ナラシン	幼すう 育成用配合飼料	40~120	3	97.8~102.2	2.7
	ブロイラー 肥育前期用配合飼料	40~120	3	99.4~102.5	2.7
	ブロイラー 肥育後期用配合飼料	40~120	3	96.3~99.8	1.9
モネンシ ンナトリ ウム	幼すう 育成用配合飼料	40~120	3	99.0~100.3	1.0
	ブロイラー 肥育前期用配合飼料	40~120	3	99.3~99.7	1.2
	ブロイラー 肥育後期用配合飼料	40~120	3	98.7~100.0	1.0
	ほ乳期子牛 育成用配合飼料1	15~45	3	94.4~98.2	2.2
	ほ乳期子牛 育成用配合飼料2	15~45	3	94.9~97.7	2.3
	ほ乳期子牛 育成用配合飼料3	15~45	3	93.3~96.5	2.7
	ほ乳期子牛 育成用配合飼料4	15~45	3	94.9~96.9	1.4
	ほ乳期子牛 育成用配合飼料5	15~45	3	93.8~96.1	1.9
	幼令牛 育成用配合飼料	15~45	3	100.3~102.0	1.2
	肉用牛 肥育用(前期)配合飼料	15~45	3	98.0~99.7	1.7
肉用牛 肥育用(後期)配合飼料	15~45	3	100.7~102.0	1.7	

・ 共同試験

添加成分	試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
サリノマイシンナトリウム	鶏用配合飼料	7	50	94.4	2.7	2.0	0.22
センデュラマイシンナトリウム	ブロイラー後期用配合飼料	7	25	97.9	1.8	1.8	0.18
ナラシン	幼すう 育成用配合飼料	7	80	99.7	2.9	2.1	0.25
モネンシンナトリウム	牛用配合飼料	6	30	98.0	2.0	2.6	0.27

2 キタサマイシン、バージニアマイシン及びリン酸タイロシンのバイオオートグラフによる微量定量試験法

- (1) 分析対象抗生物質 KT、VM 及び TS
- (2) 適用範囲 飼料
- (3) 分析法

A 試薬等の調製

- 1) キタサマイシン標準液 常用標準キタサマイシン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、メタノール 10 mL を加えて溶かし、更に同溶媒を正確に加えて 1 mg(力価)/mL のキタサマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

- 2) バージニアマイシン標準液 常用標準バージニアマイシン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のバージニアマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

- 3) タイロシン標準液 常用標準タイロシン適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で3時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、メタノール少量を正確に加えて溶かし、更に4号緩衝液を正確に加えて1 mg(力価)/mL のタイロシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

- 4) 培地 F-111号培地

- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、100倍希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。

- 6) 展開溶媒

i) ヘキサン-酢酸エチル-アセトン-メタノール (4+2+1+1)

ii) アセトニトリル-メタノール (17+3)

- 7) 硫酸ナトリウム (無水) 110~120 °C で2時間乾燥し、デシケーター中で冷却する。

- 8) 発色試薬 3-(4-ヨードフェニル)-2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウムクロリド 100 mg を水に溶かして 200 mL とする。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料 40.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル 100 mL を加え、30分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5種 A) でろ過する。ろ液 50 mL を 100 mL のなす形フラスコに入れ、50 °C の水浴で減圧乾固した後、クロロホルム-酢酸エチル (9+1) 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 シリカゲルミニカラム (690 mg) をクロロホルム 10 mL で洗浄する。

硫酸ナトリウム (無水) 約 40 g を入れた漏斗をミニカラムの上に置き、試料溶液を漏斗に入れ、そのミニカラムのリザーバー内の残量が 1 mL に達するまで自然流下させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをクロロホルム-酢酸エチル (9+1) 10 mL で洗浄し、洗液を先の漏斗に加え、同様に3回操作する。

先の漏斗中の硫酸ナトリウムをクロロホルム-酢酸エチル (9+1) 10 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加えた後、漏斗をとりはずし、クロロホルム-酢酸エ

チル (9+1) 20 mL をミニカラムに加え、ミニカラムを洗浄する。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、クロロホルム-メタノール (4+1) 30 mL をミニカラムに加えて KT、VM 及び TS を溶出させる。溶出液を 50 °C の水浴で減圧乾固した後、メタノール 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、試料溶液を調製する。

C 定 量

第 1 節 2 の C による。

ただし、薄層板は、シリカゲル薄層板^{注 1}を用い、展開溶媒の上達線が原線から 150 mm の高さに達するまで展開する。

注 1 TLC plate Silica gel 60 (20×20 cm) (Merck 製) 又はこれと同等のものを 110 °C で 2 時間乾燥して用いる。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
キタサマイシン	成鶏用配合飼料	0.1~1	3	97.7~106.0	6.5
	肉豚用配合飼料	0.1~1	3	105.0~113.3	13.5
	乳牛用配合飼料	0.1~1	3	100.0~107.0	8.0
バージニアマイシン	成鶏用配合飼料	0.1~1	3	96.0~106.0	9.1
	肉豚用配合飼料	0.1~1	3	94.7~110.0	9.1
	乳牛用配合飼料	0.1~1	3	100.0~102.3	6.5
リン酸タイロシン	成鶏用配合飼料	0.1~1	3	101.3~106.0	6.5
	肉豚用配合飼料	0.1~1	3	97.7~107.0	9.8
	乳牛用配合飼料	0.1~1	3	98.0~98.7	6.2

・検出下限 試料中 各 0.5 g(力価)/t

3 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる微量定量試験法

- (1) 分析対象抗生物質 SL、MN 及び LS
- (2) 適用範囲 飼料
- (3) 分析法

A 試薬等の調製

- 1) サリノマイシン標準液 常用標準サリノマイシン適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で 3 時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のサリノマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

- 2) モネンシン標準液 常用標準モネンシン 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のモネンシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL

の各標準液を調製する。

- 3) ラサロシド標準液 常用標準ラサロシド 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のラサロシド標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。
- 4) 培地 F-22 号培地
- 5) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 6) 展開溶媒
 - i) 酢酸エチル-ヘキサン-アセトン-メタノール (20+8+1+1)
 - ii) 酢酸エチル-アンモニア水 (180+1)
- 7) 硫酸ナトリウム (無水) 110~120 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷する。
- 8) 発色試薬 3-(4-ヨードフェニル)-2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウムクロリド 100 mg を水に溶かして 200 mL とする。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料 40.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液 50 mL を 100 mL のなす形フラスコに入れ、50 °C の水浴で減圧乾固した後、クロロホルム-酢酸エチル (9+1) 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 シリカゲルミニカラム (690 mg) をクロロホルム 10 mL で洗浄する。

硫酸ナトリウム (無水) 約 40 g を入れた漏斗をミニカラムの上に置き、試料溶液を漏斗に入れ、そのミニカラムのリザーバー内の残量が 1 mL に達するまで自然流下させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをクロロホルム-酢酸エチル (9+1) 10 mL で洗浄し、洗液を先の漏斗に加え、同様に 3 回操作する。

先の漏斗中の硫酸ナトリウムをクロロホルム-酢酸エチル (9+1) 10 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加えた後、漏斗をとりはずし、クロロホルム-酢酸エチル (9+1) 20 mL をミニカラムに加え、ミニカラムを洗浄する。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、クロロホルム-メタノール (4+1) 30 mL をミニカラムに加えて SL、MN 及び LS を溶出させる。溶出液を 50 °C の水浴で減圧乾固した後、メタノール 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、試料溶液を調製する。

C 定 量

第 1 節 2 の C による。

ただし、薄層板はシリカゲル薄層板^{注 1}を用い、展開溶媒の上達線が薄層板の上端に達するまで展開する。

注 1 TLC plate Silica gel 60 (20×20 cm) (Merck 製) 又はこれと同等のものを

110 °C で 2 時間乾燥して用いる。

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
サリノマイシン ンナトリウム	成鶏用配合飼料	0.1~1	3	102.0~110.0	8.9
	肉豚用配合飼料	0.1~1	3	106.7~120.0	8.3
	乳牛用配合飼料	0.1~1	3	104.7~116.7	9.9
モネンシンナ トリウム	成鶏用配合飼料	0.1~1	3	97.3~106.7	5.4
	肉豚用配合飼料	0.1~1	3	99.3~106.0	11.5
	乳牛用配合飼料	0.1~1	3	98.7~110.0	5.2
ラサロシドナ トリウム	成鶏用配合飼料	0.1~1	3	94.0~116.0	18.6
	肉豚用配合飼料	0.1~1	3	91.3~112.0	21.7
	乳牛用配合飼料	0.1~1	3	94.7~112.0	21.7

・ 検出下限 試料中 各 0.5 g(力価)/t

4 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフ質量分析計による微量定量試験法

- (1) 分析対象抗生物質 SL、SD、NR、MN 及び LS (5 成分)
- (2) 適用範囲 配合飼料
- (3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) 各抗生物質標準原液 常用標準サリノマイシン^{注1}、常用標準センドデュラマイシン、常用標準ナラシン、常用標準モネンシン及び常用標準ラサロシド各 20 mg(力価)相当量を正確に量って、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、更に標線まで同溶媒を加えて各標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、それぞれサリノマイシンナトリウム、センドデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムとして 0.2 mg(力価)相当量を含有する。）。
- 2) 混合標準液 使用に際して、サリノマイシンナトリウム標準原液、センドデュラマイシンナトリウム標準原液、ナラシン標準原液、モネンシンナトリウム標準原液及びラサロシドナトリウム標準原液の一定量を混合し、メタノールで正確に希釈し、1 mL 中に各抗生物質としてそれぞれ 0.1~2 µg(力価)相当量を含有する数点の混合標準液を調製する。

B 定 量

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

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

カラム処理 シリカゲルミニカラム (690 mg) をヘキサン 10 mL で洗浄し、あ

らかじめ硫酸ナトリウム（無水）約 20 g を入れた漏斗をミニカラムのリザーバー部分の上に置く。

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

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

メタノール 10 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質量分析計による測定 試料溶液及び各混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出クロマトグラムを得る。

測定条件例

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

溶離液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル（1+4）

流速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

検出器：四重極型質量分析計^{注3}

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（1.5 L/min）

C D L 温度：250 °C

ヒートブロック温度：200 °C

モニターイオン：*m/z* 769（サリノマイシン）
m/z 891（センデュラマイシン）
m/z 783（ナラシン A）
m/z 688（モネンシン A）
m/z 608（ラサロシド）

計算 得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中の各抗生物質量^{注4}を算出する。

注 1 適量を減圧下（0.67 kPa 以下）、60 °C で3時間乾燥したもの

2 Gemini 5µ C18 110A（Phenomenex 製、本測定条件によるサリノマイシン、センデュラマイシン、ナラシン A、モネンシン A 及びラサロシドの保持時

間は、それぞれ約 9 分、約 6 分、約 13 分、約 8 分及び約 4 分) 又はこれと同等のもの

3 LCMS-2010EV (島津製作所製) による条件例

4 ナラシンについては、算出したナラシン A 量をナラシン量とする。また、モネンシンについては、算出したモネンシン A 量をモネンシンナトリウム量とする。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
サリノマイシン ナトリウム	成鶏飼育用配合飼料	0.5~5	3	95.0~96.2	2.4
	肉豚肥育用配合飼料	0.5~5	3	95.5~98.4	2.3
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5~5	3	89.7~98.8	2.9
センデュラマイシン ナトリウム	成鶏飼育用配合飼料	0.5~5	3	89.4~89.5	1.2
	肉豚肥育用配合飼料	0.5~5	3	80.0~84.6	10
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5~5	3	88.7~90.0	3.9
ナラシン	成鶏飼育用配合飼料	0.5~5	3	86.8~88.9	7.6
	肉豚肥育用配合飼料	0.5~5	3	83.0~88.3	6.6
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5~5	3	83.4~89.7	13
モネンシン ナトリウム	成鶏飼育用配合飼料	0.5~5	3	104.3~108.7	1.5
	肉豚肥育用配合飼料	0.5~5	3	104.1~104.5	0.9
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5~5	3	103.7~107.5	1.1
ラサロシド ナトリウム	成鶏飼育用配合飼料	0.5~5	3	91.6~94.5	2.8
	肉豚肥育用配合飼料	0.5~5	3	86.0~91.4	4.5
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5~5	3	85.2~89.4	3.8

・共同試験

分析成分名	試料の種類	試験 室数	添加濃度 (g(力 価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _i (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
サリノマイシン ナトリウム	成鶏飼育用 配合飼料	8	0.5	95.0	2.7	6.4	0.36
センデュラマイシン ナトリウム	成鶏飼育用 配合飼料	8	0.5	98.6	2.6	8.0	0.45
ナラシン	成鶏飼育用 配合飼料	8	0.5	88.5	3.5	5.7	0.31
モネンシン ナトリウム	成鶏飼育用 配合飼料	8	0.5	101.0	3.6	5.0	0.28
ラサロシド ナトリウム	成鶏飼育用 配合飼料	8	0.5	93.3	3.8	8.2	0.46

・検出下限 試料中 0.5 g(力価)/t

5 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる確認試験法

5.1 プレミックス

(1) 確認対象抗生物質 SL、MN 及び LS

(2) 分析法

A 試薬等の調製

1) サリノマイシン標準液 3のAの1)により 1 mg(力価)/mL のサリノマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、10 µg(力価)/mL の標準液を調製する。

2) モネンシン標準液 3のAの2)により1 mg(力価)/mLのモネンシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、10 µg(力価)/mLの標準液を調製する。

3) ラサロシド標準液 3のAの3)により1 mg(力価)/mLのモネンシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、10 µg(力価)/mLの標準液を調製する。

4) 培地 F-22号培地

5) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^7 個/mLの孢子液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。

6) 抽出溶媒 メタノール-水 (9+1) (LS にあってはメタノール)

7) 展開溶媒 酢酸エチル-ヘキサン-アセトン-メタノール (20+8+1+1)

8) 発色試薬 3-(4-ヨードフェニル)-2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウムクロリド 100 mg を水に溶かして 200 mL とする。

B 試料溶液の調製

分析試料 3~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。

ろ液の一定量を抽出溶媒で正確に希釈し、10 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 同 定

第 1 節 2 の C の薄層クロマトグラフィー、寒天平板の調製、培養及び同定の項による。

ただし、薄層板はシリカゲル薄層板^{注 1}を用い、標準液及び試料溶液各 25 µL をスポットし、展開溶媒の上達線が薄層板の上端に達するまで展開する。

注 1 TLC plate Silica gel 60 (20×20 cm) (Merck 製) 又はこれと同等のものを 110 °C で 2 時間乾燥して用いる。

5.2 飼料

(1) 確認対象抗生物質 SL、MN 及び LS

(2) 分析法

A 試薬等の調製

5.1 の(2)の A による。

B 試料溶液の調製

分析試料の一定量 (SL 若しくは MN として 0.5 mg(力価)相当量又は LS として 1 mg(力価)相当量) を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 50 mL (LS にあってはクロロホルム 100 mL) を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過し、10 µg(力価)/mL の試料溶液を調製する。

C 同 定

5.1 の(2)の C による。