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 °C で 3 時間乾燥した後、40 mg 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部を 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－ピリジン－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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部を 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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部を 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_r（%）
亜鉛バシトラシン	ビタミンプレミックス	24	3	101	1.4
		84	3	100	0.8
		168	3	99.6	2.8
	ビタミン・ミネラルプレミックス	24	3	99.3	3.4
		84	3	101	1.6
		168	3	100	0.8

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、標準原液の一部を 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

分析試料の一部（BC として 20 単位相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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_r（%）
亜鉛バシトラシン	幼すう用配合飼料	84	6	96.0	6.1
		168	6	99.6	1.1
		420	6	97.9	3.1
	ほ乳期子豚用配合飼料	84	6	98.0	3.3
		168	6	96.6	5.1
		420	6	97.9	5.9
	ほ乳期子牛用配合飼料	84	6	95.0	5.0
		168	6	94.6	3.9
		420	6	96.2	4.8

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（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（%）
幼すう用配合飼料	5	0	168	102	2.0	2.2

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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。

ろ液の一部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、目開き 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[注1] 3~5 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、50 mL 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[注1] 3~5 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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_r (%)
鶏用プレミックス1	0.2	3	97.3	7.2
	1	3	95.3	3.4
	5	3	99.7	9.9
鶏用プレミックス2	0.2	3	99.7	12
	1	3	104	6.4
	5	3	105	1.9
豚用プレミックス	0.2	3	95.7	7.0
	1	3	94.7	8.0
	5	3	103	7.8

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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 (%)	HorRat
鶏用プレミックス	8	0	1	102	3.4	5.7	1.0

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、標準原液の一部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[注1] 3~5 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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。ろ液の一部をアセトン濃度が 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）[注2] 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[注3] 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[注3] 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、この液の一部をアセトン濃度が 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、目開き 0.5 mm の網ふるいを通過するように粉砕する。

2　Sep-Pak Plus C_{18} Cartridge（Waters 製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

3　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[注1] 3~5 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、50 mL 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[注1] 3~5 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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_r (%)
鶏用プレミックス1	0.2	3	100	8.6
（AVMの20倍のSL含有）	1	3	106	4.6
鶏用プレミックス1	0.2	3	90.3	5.5
（AVMの30倍のLS含有）	1	3	105	3.3
鶏用プレミックス2	0.2	3	110	11
（AVMの20倍のSL含有）	1	3	101	0.6
鶏用プレミックス2	0.2	3	93.3	7.6
（AVMの30倍のLS含有）	1	3	99.7	4.6

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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 (%)	HorRat
鶏用プレミックス	8	0	1	101	2.3	4.3	0.77

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、標準原液の一部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 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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。

ろ液の一部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、目開き 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_r（%）
豚用配合飼料1	10	3	95.6	7.8
	20	3	108	6.1
	40	3	107	1.6
豚用配合飼料2	10	3	111	4.4
	20	3	97.6	0.5
	40	3	100	1.1
豚用配合飼料3	10	3	113	5.6
	20	3	94.1	3.2
	40	3	106	4.4

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（g(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
子豚育成用配合飼料	8	0	20	101	4.0	5.5	0.54

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、標準原液の一部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 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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）[注1] 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、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させた後、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。

注 1　Sep-Pak Plus Silica 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

（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（%）
幼すう用配合飼料	2.5	3	106	4.8
	10	3	98.3	6.5
	40	3	99.2	3.0
ブロイラー前期用配合飼料	2.5	3	107	5.3
	10	3	102	6.9
	40	3	103	2.9
ほ乳期子豚用配合飼料	2.5	3	107	2.0
	10	3	93.7	1.9
	40	3	103	9.0

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
ブロイラー前期用配合飼料	11	0	12.5	101	4.5	4.5	0.41

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部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) 胞子液及び添加量　　試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 11774 を用い、1×10^7 個/mL の胞子液を調製し、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、胞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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部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_r (%)
幼すう用プレミックス	2	3	109	5.6
	5	3	100	3.5
	10	3	105	4.5
中すう用プレミックス	2	3	99.0	4.6
	5	3	103	5.4
	10	3	110	3.2
ブロイラー用プレミックス	2	3	99.0	1.0
	5	3	107	7.6
	10	3	100	4.1

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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 (%)	HorRat
中すう用プレミックス	7	0	5	99.6	5.2	5.2	1.2

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、標準原液の一部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)　胞子液及び添加量　試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 11774 を用い、1×10^7 個/mL の胞子液を培地 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。

ただし、胞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

分析試料の一部（AV として 200 µg (力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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_r (%)
幼すう用配合飼料	7.5	3	102	1.9
	15	3	103	12
	30	3	104	4.2
中すう用配合飼料	7.5	3	97.3	9.8
	15	3	95.2	11
	30	3	100	14
ブロイラー後期用配合飼料	7.5	3	104	4.3
	15	3	101	16
	30	3	109	7.7

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
ブロイラー後期用配合飼料	6	0	10	100	6.1	6.4	0.57

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又はこれと同等のもの 40 mg 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、塩酸（10 mmol/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、標準原液の一部を 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 *Kocuria rhizophila* 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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部を 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_r (%)
塩酸オキシテトラサイクリン	ビタミンプレミックス	5	3	98.5	1.7
		10	3	99.1	0.8
		20	3	99.2	2.3
	ビタミン・ミネラルプレミックス	5	3	98.1	1.2
		10	3	99.3	0.6
		20	3	100	1.1

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、標準原液の一部を 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、標準原液の一部を 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)　胞子液及び添加量

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 の胞子液を培地 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　　胞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

分析試料の一部（OTC として 400 µg (力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL

を加え、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

分析試料の一部（OTC として 80 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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

分析試料の一部（OTC として 80 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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_r (%)
塩酸オキシテトラサイクリン	幼すう用配合飼料	5	6	104	3.3
		50	6	100	0.6
		100	6	98.3	3.1
	ほ乳期子豚用配合飼料	5	6	104	5.8
		50	6	109	4.0
		100	6	106	5.4
	ほ乳期子牛用配合飼料	5	6	101	7.4
		50	6	107	2.3
		100	6	103	3.1

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
塩酸オキシテトラサイクリン	子牛用配合飼料	3	0	50	106	4.5	9.0	1.0

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、標準原液の一部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)相当量を含有する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 400 µg (力価)相当量以下）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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（68.075~68.084 g）、酢酸マグネシウム四水和物 10.72 g（10.715~10.724 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（0.365~0.374 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

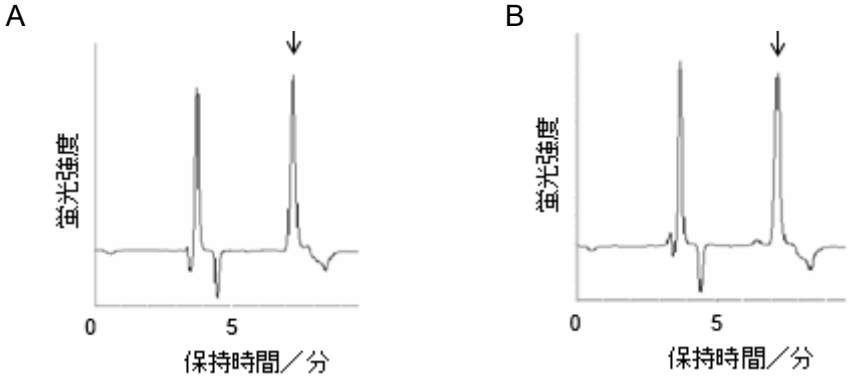
・添加回収率及び繰返し精度

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_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	10	3	95.9	0.4
		15	3	97.6	1.6
		50	3	99.8	2.1
		100	3	101	1.6
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	10	3	97.1	3.5
		15	3	96.6	2.9
		50	3	103	1.6
		100	3	104	2.1
	ほ乳期子牛育成用配合飼料	10	3	93.3	2.2
		15	3	95.5	3.9
		50	3	98.9	0.4
		100	3	101	1.3

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（g(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
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	0	50	95.6	1.3	3.9	0.44

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（OTC として 50 ng（力価）注入）

B：添加試料（中すう育成用配合飼料に OTC として 50g（力価）/t 相当量添加）

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部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) 胞子液及び添加量　　試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 19637 を用い、1×10^7 個/mL の胞子液を培地 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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。ろ液の一部を希釈溶媒で正確に希釈し、1.6 μg(力価)/mL の高濃度試料溶液及び 0.4 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_r (%)
豚用プレミックス1	1	3	97.6	2.9
	3	3	102	2.8
	8	3	97.8	2.4
豚用プレミックス2	1	3	99.5	3.6
	3	3	102	5.4
	8	3	99.0	2.6
豚用プレミックス3	1	3	101	5.0
	3	3	103	3.4
	8	3	101	4.1

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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 (%)	HorRat
豚用プレミックス	7	0	3	98.5	1.8	4.0	0.18

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、標準原液の一部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-6 号培地

5) 胞子液及び添加量　　試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 19637 を用い、1×10^7 個/mL の胞子液を培地 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　　分析試料の一部（ET として 40~320 μg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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）[注1] 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、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させる[注2]。更に、酢酸エチルーアンモニア水（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、その溶液の一部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　Sep-Pak Plus Silica 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	有効試験室数	棄却試験室数	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
ほ乳期子豚用配合飼料	8	0	8	104	3.4	4.6	0.40

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部を 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 *Kocuria rhizophila* 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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部を 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_r（%）
ビタミンプレミックス	1	3	99.1	0.5
	5	3	99.3	0.5
	10	3	99.9	0.2
ビタミン・ミネラルプレミックス	1	3	99.1	0.2
	5	3	100	0.8
	10	3	100	0.7

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、標準原液の一部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 *Kocuria rhizophila* 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

分析試料の一部（SP として 500 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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）の一部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

分析試料の一部（SP として 200 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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

分析試料の一部（SP として 50 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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

分析試料の一部（SP として 500 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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、ろ液の一部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

分析試料の一部（SP として 200 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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

分析試料の一部（SP として 50 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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_r (%)
幼すう用配合飼料	5	6	101	1.5
	20	6	101	1.2
ブロイラー前期用配合飼料	5	6	102	2.4
	20	6	101	1.2
ほ乳期子豚用配合飼料	5	6	99.5	3.5
	20	6	102	1.6
	100	6	103	2.2

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
ほ乳期子豚用配合飼料	7	0	20	97.1	4.5	6.2	0.60

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部を 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（75 mmol/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）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部を 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）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部を 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_r (%)
鶏用プレミックス1	0.5	3	101	5.0
	5	3	97.6	2.9
	10	3	94.6	0.4
鶏用プレミックス2	0.5	3	99.9	2.9
	5	3	97.0	1.8
	10	3	98.1	4.3
豚用プレミックス	0.5	3	93.6	1.9
	5	3	93.6	2.5
	10	3	95.7	1.2

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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 (%)	HorRat
鶏用プレミックス	7	0	5	97.4	0.9	3.1	0.70

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、標準原液の一部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

分析試料の一部（ER として 80 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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

分析試料の一部（ER として 80 μg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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、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_r (%)
幼すう用配合飼料	5	4	97.5	1.8
	10	4	102	6.5
	20	4	102	2.8
中すう用配合飼料	5	4	103	3.2
	10	4	101	1.5
	20	4	105	2.0
ほ乳期子豚用配合飼料	5	4	104	5.5
	10	4	101	2.0
	20	4	104	3.3
子豚育成用配合飼料	5	4	103	5.8
	10	4	104	2.4
	20	4	107	2.8

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
ほ乳期子豚用配合飼料	5	0	10	100	5.5	6.7	0.59

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部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) 胞子液及び添加量　　試験菌として *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 を用い、1×10^8 個/mL の胞子液を培地 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　　分析試料の一部（OR が 5 g(力価)/t 以上の場合には、OR として 100 µg(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）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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 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 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 100 µg(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 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。

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 C_{18} Environmental 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_r（%）
幼すう用配合飼料	2.5	3	99.7	9.5
	5	3	109	2.1
	10	3	99.3	18
ブロイラー前期用配合飼料	2.5	3	104	16
	5	3	96.7	10
	10	3	101	6.9
ブロイラー後期用配合飼料	2.5	3	97.7	7.0
	5	3	95.0	5.8
	10	3	115	7.0

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（g(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
幼すう用配合飼料	6	0	5	99.8	6.5	6.5	0.52

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部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 *Kocuria rhizophila* 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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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。

ろ液の一部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_r（%）
ビタミンプレミックス	1	3	99.7	1.3
	2	3	99.9	1.3
	5	3	100	1.0
ビタミン・ミネラル プレミックス	1	3	99.9	1.3
	2	3	100	1.3
	5	3	101	0.8

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、標準原液の一部を 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 *Kocuria rhizophila* 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

分析試料の一部（KT として 500 µg (力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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。

ろ液の一部を 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

分析試料の一部（KT として 100 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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。

ろ液の一部を 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_r (%)
幼すう用配合飼料	5.6	6	99.3	0.8
	11.1	6	99.7	1.3
ブロイラー前期用配合飼料	5.6	6	101	1.4
	11.1	6	101	1.0
ほ乳期子豚用配合飼料	5.6	6	100	2.0
	11.1	6	101	1.0
	25	6	101	1.8
	50	6	101	1.4
	100	6	101	2.1

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
ほ乳期子豚用配合飼料	5	0	100	102	4.4	6.5	0.81

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、標準原液の一部を 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 *Kocuria rhizophila* 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)　発色試薬　　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 0.10 g（0.095~0.104 g）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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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。ろ液の一部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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えて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、標準原液の一部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、先の標準液の一部を水－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 50 ng 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　　安定同位体標識クロラムフェニコール（CP-d_5）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-d_5 として 1 μg を含有する標準液を調製する。

使用に際して、先の標準液の一部をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に CP-d_5 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部を水－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-d_5 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 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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]）

検出器：四重極型質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（負イオンモード）

ネブライザーガス: N_2（600 L/h）
コーンガス　: N_2（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　各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン（*m/z*）	プロダクトイオン 定量用（*m/z*）	プロダクトイオン 確認用（*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-d_5 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　富士フイルム和光純薬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）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

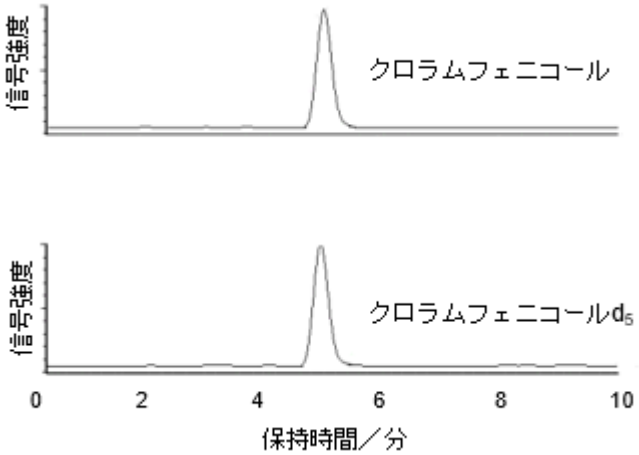
試料の種類	添加濃度（μg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
ブロイラー肥育前期用配合飼料	5	3	94.2	12
	25	3	101	1.6
ほ乳期子豚育成用配合飼料	5	3	101	2.1
	25	3	99.0	5.5
ぎんざけ育成用配合飼料	2	3	89.6	12
	5	3	97.7	3.8
	25	3	93.5	4.5
魚粉	2	3	107	9.4
	5	3	99.9	6.6
	25	3	98.4	4.7

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（μg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
ブロイラー肥育前期用配合飼料	8	0	5	104	4.5	5.5	0.25
魚粉	8	0	5	104	4.8	5.6	0.25

・検出下限（単一試験室による確認）　　試料中　2 μg/kg

（参考）クロマトグラム例



添加試料（ほ乳期子豚育成用配合飼料に CP として 5 μg/kg 相当量添加）のクロマトグラム

10.1.2　液体クロマトグラフタンデム型質量分析計法（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〔$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$〕10 mg を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えて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、標準原液の一部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　　安定同位体標識クロラムフェニコール（CP-d_5）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-d_5 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　　内標準原液の一部をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に CP-d_5 として 250 ng を含有する内標準液を調製する。更に、クロラムフェニコール標準液及び先の内標準液の一部を水－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-d_5 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部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中に CP-d_5 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 5.0 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の共栓遠心沈殿管[注2] に入れ、添加用内標準液 1 mL を正確に加える。更にメタノール－1 w/v%メタリン酸溶液（3+2）100 mL を加え[注3]、ホモジナイザーで 1

分間かき混ぜて抽出する[注4]。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、更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5]　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6]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。更に水 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7]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8]

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9]）

検出器：四重極型質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（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　各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン 定量用 (m/z)	プロダクトイオン 確認用 (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	―	100	10
		―	257	100	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-d_5 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　かき混ぜ時に抽出液が溢れる等して操作が困難な場合は、使用するホモジナイザーに適した容器を用いる。又は、注 4 に記載の機種に代えて、カップ型式のホモジナイザー（エースホモジナイザー（日本精機製）等）を用いる。

3　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、まずメタノール－1 w/v%メタリン酸溶液（3+2）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。

4　HG-200（Hsiangtai 製）又はこれと同等のもの

5　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。

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

7　クロラムフェニコールの吸着性のないもの

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

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

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

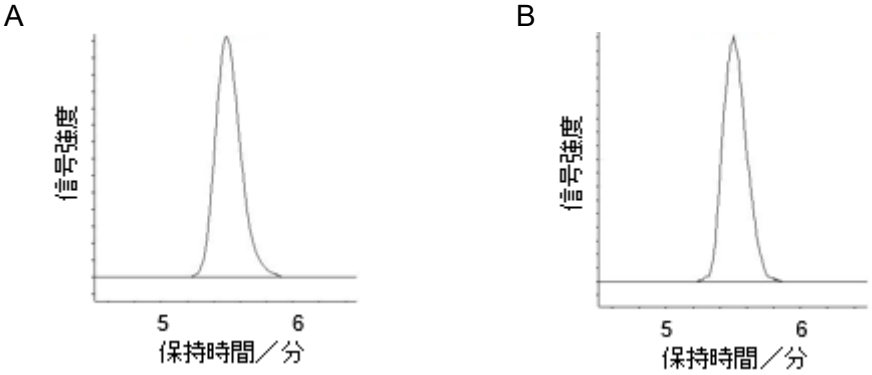
試料の種類	添加濃度（μg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
脱脂粉乳1	0.5	3	99.3	7.3
	1	3	94.2	6.2
	25	3	95.4	2.7
脱脂粉乳2	0.5	3	93.8	12
	1	3	102	1.0
	25	3	96.4	1.2
脱脂粉乳3	1	3	98.7	3.7
	25	3	95.2	3.4
脱脂粉乳4	1	3	99.6	3.1
	25	3	99.4	5.8

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（μg/kg）	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（単一試験室による確認）　　試料中　0.5 μg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（CP として 10 ng/mL）

B：添加試料（脱脂粉乳に CP として 1 μg/kg 相当量添加）

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〔$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$〕20 mg を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えて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、標準原液の一部をアセトニトリル－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 25~500 ng 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 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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（4.5~5.5 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、クロロホルムーメタノール（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、クロロホルムーメタノール（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。

アセトニトリルー水（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：水ーアセトニトリル（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

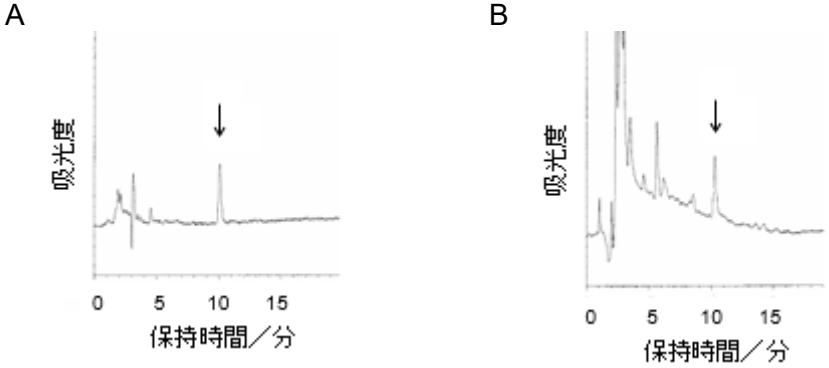
試料の種類	添加濃度（µg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
脱脂粉乳1	10	3	102	3.8
	50	3	96.0	1.7
脱脂粉乳2	10	3	96.5	10
	50	3	96.3	0.6

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（µg/kg）	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	0	10	98.1	4.7	6.4	0.29

・定量下限（単一試験室による確認）　試料中　5 µg/kg
・検出下限（単一試験室による確認）　試料中　2 µg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（CP として 1 ng 注入）

B：添加試料（脱脂粉乳に CP として 10 µg/kg 相当量添加）

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部を 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 *Kocuria rhizophila* 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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部を 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_r (%)
ビタミンプレミックス	10	3	99.3	0.7
	20	3	99.9	0.2
	40	3	100	1.7
ビタミン・ミネラルプレミックス	10	3	99.3	0.6
	20	3	101	1.0
	40	3	99.1	0.7

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、標準原液の一部を 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 *Kocuria rhizophila* 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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、2,4,6-トリ-2-ピリジル-1,3,5-トリアジン 3.0 g（2.95~3.04 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、この液の一部を 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_r (%)
鶏用プレミックス	10	3	102	1.5
	20	3	101	3.6
	50	3	100	3.5
豚用プレミックス	10	3	100	3.2
	20	3	95.7	2.6
	50	3	97.7	4.8
牛用プレミックス	10	3	98.0	1.0
	20	3	96.3	2.6
	50	3	101	4.3

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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 (%)	HorRat
牛用プレミックス	8	0	20	100	2.3	2.8	0.77

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、標準原液の一部を 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 *Kocuria rhizophila* 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

分析試料の一部（CTC として 400 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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_r（%）
幼すう用配合飼料	50	6	94.3	3.7
	100	6	99.8	3.4
ほ乳期子豚用配合飼料	50	6	96.8	2.1
	100	6	96.3	3.2
ほ乳期子牛用配合飼料	50	6	98.2	3.4
	100	6	97.7	2.1

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（g(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
子牛用配合飼料	3	0	50	102	3.1	4.7	0.53

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、標準原液の一部を 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)　胞子液及び添加量　　試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 11778 を用い、1×10^6 個/mL の胞子液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。

5)　寒天平板　　胞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

分析試料の一部（CTC として 64 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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_r（%）
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	有効試験室数	棄却試験室数	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
子牛用配合飼料	3	0	10	104	4.7	6.6	0.59

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、標準原液の一部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 200 µg(力価)相当量以下）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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（68.075~68.084 g）、酢酸マグネシウム四水和物 10.72 g（10.715~10.724 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（0.365~0.374 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

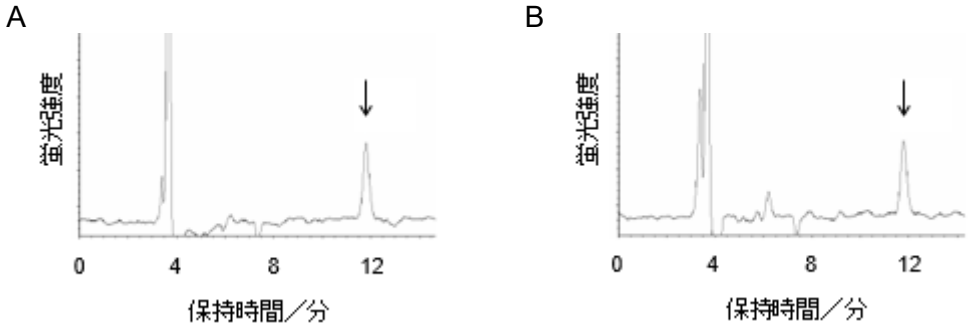
・添加回収率及び繰返し精度

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_r（%）
幼すう用配合飼料	10	3	93.4	7.5
	30	3	104	2.9
ほ乳期子牛育成用配合飼料	10	3	95.3	3.6
	30	3	99.6	2.9
若令牛育成用配合飼料	10	3	91.6	5.2
	30	3	98.4	4.4

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
ほ乳期子牛用配合飼料	8	0	50	96.8	2.1	4.3	0.48

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（CTC として 25 ng 注入）

B：添加試料（ほ乳期子牛育成用配合飼料に CTC として 50 g(力価)/t 相当量添加）

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部を 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。

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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部を 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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。ろ液の一部を 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_r (%)
ビタミンプレミックス	0.5	3	100	2.5
	1	3	99.6	1.3
	2	3	99.9	1.5
ビタミン・ミネラルプレミックス	0.5	3	99.0	0.8
	1	3	100	1.8
	2	3	99.9	1.1

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部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)　胞子液及び添加量　　試験菌として *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 を用い、1×10^8 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　　円筒法による。

6)　抽出溶媒　　メタノール－水（9+1）

7)　塩基性アルミナ　　カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（粒径 63~200 µm（230~70 メッシュ））[注1] を 130 °C で 2 時間乾燥し、6 v/w %相当量の水を加えて混和し、一夜静置する。

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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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）に塩基性アルミナ 12 g（11.5~12.5 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部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。

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

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
ビタミンプレミックス	10	3	101	2.3
	20	3	101	2.1
	40	3	101	1.6
ビタミン・ミネラルプレミックス	10	3	99.7	1.1
	20	3	99.3	0.4
	40	3	99.8	1.0

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、標準原液の一部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) 胞子液及び添加量　試験菌として *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 を用い、1×10^7 個/mL の胞子液を培地 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）

7) 塩基性アルミナ　カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（粒径 63~200 µm（230~70 メッシュ））[注1]を 130 °C で 2 時間乾燥し、6 v/w %相当量の水を加えて混和し、一夜静置する。

B　試料溶液の調製

分析試料の一部（SL として 500 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 50 mL を加え、20 分間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）に塩基性アルミナ 12 g（11.5~12.5 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部を水－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。

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

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r（%）
幼すう用配合飼料	37.5	6	99.4	0.9
	50	6	98.9	1.3
	62.5	6	99.2	1.4
中すう用配合飼料	37.5	6	98.7	1.7
	50	6	98.5	1.4
	62.5	6	98.9	1.5

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
中すう用配合飼料	4	0	50	104	3.2	5.5	0.63

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、標準原液の一部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) 胞子液及び添加量　試験菌として *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 を用い、1×10^7 個/mL の胞子液を培地 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）

7) 塩基性アルミナ　カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（粒径 63~200 µm（230~70 メッシュ））[注1] を 130 °C で 2 時間乾燥し、6 v/w %相当量の水を加えて混和し、一夜静置する。

B　試料溶液の調製

分析試料の一部（SL として 200 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 50 mL を加え、20 分間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）に塩基性アルミナ 12 g（11.5~12.5 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部を水－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。

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

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r（%）
牛用配合飼料1	10	3	111	1.6
	20	3	99.1	3.4
	30	3	97.9	14
牛用配合飼料2	10	3	107	4.9
	20	3	101	1.4
	30	3	101	3.1
牛用配合飼料3	10	3	104	2.6
	20	3	101	3.8
	30	3	105	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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部を 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 *Kocuria rhizophila* 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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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。

ろ液の一部を 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（富士フイルム和光純薬製（販売終了））又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
ほ乳期子豚用プレミックス	2.5	3	96.0	2.8
	5	3	103	4.0
	10	3	99.7	4.9
子豚用プレミックス1	2.5	3	100	5.0
	5	3	101	5.2
	10	3	101	2.5
子豚用プレミックス2	2.5	3	102	8.3
	5	3	96.7	4.2
	10	3	101	2.0

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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 (%)	HorRat
ほ乳期子豚用プレミックス	7	0	5	104	2.2	4.2	0.33

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、標準原液の一部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 *Kocuria rhizophila* 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）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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 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。

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）[注1] 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2] 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2] 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　Sep-Pak Plus Silica 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_r（%）
ほ乳期子豚前期用配合飼料	5	3	104	3.4
	10	3	106	2.6
	20	3	99.4	2.8
ほ乳期子豚後期用配合飼料	5	3	108	5.3
	10	3	100	6.1
	20	3	101	8.7
子豚用配合飼料	5	3	96.3	3.6
	10	3	102	5.3
	20	3	99.2	3.3

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
ほ乳期子豚後期用配合飼料	10	0	10	101	3.1	3.9	0.34

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（1.15~1.24 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、標準原液の一部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。

6) 培　地　F-4 号培地

7) 菌液及び添加量　試験菌として *Kocuria rhizophila* 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 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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 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　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_r（%）
ほ乳期子豚用配合飼料	5	3	105	11
	10	3	98.0	5.4
	20	3	110	8.0
子豚用配合飼料	5	3	96.3	4.7
	10	3	105	7.6
	20	3	102	7.4

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
ほ乳期子豚用配合飼料	8	0	10	98.8	2.8	4.9	0.43

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部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 spizizenii* ATCC 6633 を用い、1×10^9 個/mL の胞子液を培地 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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。ろ液の一部を抽出溶媒で 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）[注1]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。

試料溶液の一部（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、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させる。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、希釈溶媒の一部を正確に加えて残留物を溶かす。この液の一部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。

注 1　Sep-Pak Plus Silica 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

（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_r (%)
鶏用プレミックス1	0.4	3	104	3.7
	2	3	103	2.4
	10	3	101	7.0
鶏用プレミックス2	0.4	3	98.0	1.8
	2	3	100	0.6
	10	3	99.0	1.7
鶏用プレミックス3	0.4	3	101	1.7
	2	3	99.7	1.2
	10	3	98.3	1.6

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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 (%)	HorRat
鶏用プレミックス	8	0	2	99.2	2.1	3.2	0.62

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 spizizenii* ATCC 6633 を用い、1×10^9 個/mL の胞子液を培地 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　　分析試料の一部（SD として 500 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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）[注1]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、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させる。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。この液の一部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。

注 1　Sep-Pak Plus Silica 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

（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 (%)
幼すう用配合飼料	25	3	107	11
	50	3	99.3	2.5
ブロイラー前期用配合飼料	25	3	97.7	2.6
	50	3	105	3.4
ブロイラー後期用配合飼料	25	3	98.3	6.5
	50	3	99.7	8.5

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
ブロイラー後期用配合飼料	7	0	25	100	3.8	4.8	0.49

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、標準原液の一部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) 胞子液及び添加量　試験菌として *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 を用い、1×10^9 個/mL の胞子液を培地 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－ヘキサン－アセトン－メタノール（20+8+1+1）

ii) アセトニトリル－酢酸エチル－アセトン（2+1+1）

6) 発色試薬　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 0.10 g（0.095~0.104 g）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 を有効数字 3 桁まで量り、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。ろ液の一部を抽出溶媒で 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）[注1] 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。

試料溶液の一部（SD として 100~500 µg(力価)相当量）をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させた後、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 2]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　Sep-Pak Plus Silica 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　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　　分析試料の一部（SD として 500 μg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、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）[注 1]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、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させる。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 2]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　Sep-Pak Plus Silica 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　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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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 3 号緩衝液－アセトン（7+3）を加えた後、ろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液の一部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_r (%)
ビタミンプレミックス	0.5	3	97.2	0.6
	1	3	97.6	1.8
	2	3	96.9	1.5
ビタミン・ミネラルプレミックス	0.5	3	97.8	0.6
	1	3	98.9	0.3
	2	3	98.0	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、標準原液の一部を 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）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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、ろ液の一部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）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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、ろ液の一部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_r（%）
幼すう用配合飼料	2	6	95.4	3.2
	5	6	93.7	3.7
	20	6	97.4	2.9
子豚用配合飼料	2	6	95.5	2.7
	5	6	95.4	1.9
	20	6	95.3	4.1

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
配合飼料	5	0	2.5	97.9	3.3	4.1	0.29

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約 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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部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) 胞子液及び添加量　　試験菌として *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 を用い、1×10^7 個/mL の胞子液を培地 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] 約 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 NH_4^+型樹脂を調製する。

別に、イオン交換樹脂約 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。

NH_4^+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　分析試料の一部（DM-A として 200 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、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、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 CG50（タイプ I）（Sigma-Aldrich 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_r（%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（49.5~50.4 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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部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)　胞子液及び添加量　　試験菌として *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 を用い、1×10^9 個/mL の胞子液を培地 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[注 1]

分析試料 2~4 g（NR として 240 mg(力価)相当量以下）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部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。

注 1　プレミックスの組成により阻止円形成が阻害され定量値が低くなる場合がある。このときは、分析試料 2~4 g（NR として 240 mg(力価)相当量以下）を量った後、18.2.1 の B によりカラム精製し、流出液の一部を希釈溶媒で正確に希釈し、高濃度試料溶液及び低濃度試料溶液を調製する。

（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_r（%）
鶏用プレミックス1	8	3	100	2.0
	40	3	98.9	0.8
	80	3	98.9	2.6
鶏用プレミックス2	8	3	101	2.3
	40	3	98.1	2.5
	80	3	98.9	1.1
鶏用プレミックス3	8	3	101	2.4
	40	3	96.6	1.6
	80	3	99.1	2.4
鶏用プレミックス4	2.5	5	100	7.0
	25	5	96.2	5.2
	50	5	97.6	1.9
鶏用プレミックス5	2.5	5	101	6.0
	25	5	99.0	6.7
	50	5	96.0	2.2
鶏用プレミックス6	2.5	5	96.7	3.5
	25	5	101	1.6
	50	5	99.1	4.4

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（49.5~50.4 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) 胞子液及び添加量　試験菌として *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 を用い、1×10^9 個/mL の胞子液を培地 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）
8) 塩基性アルミナ　カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（粒径 63~200 μm（230~70 メッシュ））[注1]を 130 °C で 2 時間乾燥し、6 v/w %相当量の水を加えて混和し、一夜静置する。

B　試料溶液の調製

分析試料[注2]の一部（NR として 800 μg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、

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）に塩基性アルミナ 12 g（11.5~12.5 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部を水－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。

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

2　併行精度の値が大きくなる場合、分析用試料を目開き 0.5 mm の網ふるいを通過するように粉砕することにより改善される場合がある。

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

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（%）
幼すう育成用配合飼料	40	3	101	2.4
	80	3	100	1.7
	120	3	98.9	0.6
ブロイラー肥育前期用配合飼料1	40	3	102	1.4
	80	3	102	3.4
	120	3	99.5	2.8
ブロイラー肥育後期用配合飼料1	40	3	99.1	3.2
	80	3	97.9	1.9
	120	3	98.9	4.3
ブロイラー肥育前期用配合飼料2	25	5	98.3	7.9
	50	5	98.0	9.9
	50注	5	92.5	2.4
	75	5	109	9.4
	75注	5	95.8	3.8
ブロイラー肥育前期用配合飼料3	25	5	105	11
	25注	5	106	1.8
	50	5	92.8	5.8
	75	5	97.6	12
	75注	5	96.3	7.7
ブロイラー肥育後期用配合飼料2	25	5	97.9	4.3
	50	5	112	4.7
	50注	5	99.2	2.5
	75	5	95.6	3.3

注　目開き 0.5 mm の網ふるいを通過するように粉砕した試料

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
幼すう育成用配合飼料	7	0	80	102	2.4	3.0	0.36

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、*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、標準原液の一部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 *Kocuria rhizophila* 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（52.45~52.54 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ー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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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。上澄み液の一部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_r（%）
鶏用プレミックス1	0.4	3	93.3	3.4
	2	3	96.0	2.8
	10	3	98.7	2.9
鶏用プレミックス2	0.4	3	94.7	0.6
	2	3	95.3	2.2
	10	3	101	1.0
鶏用プレミックス3	0.4	3	93.3	0.6
	2	3	99.3	1.5
	10	3	98.3	2.1

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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（%）	HorRat
鶏用プレミックス	8	0	2	99.9	2.0	4.9	0.95

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、標準原液の一部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 *Kocuria rhizophila* 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 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、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、流下させて NH を溶出させる。溶出液を 50 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固させた後、希釈溶媒 20 mL を正確に加えて残留物を溶かす。この液の一部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 tC_{18} 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_r（%）
幼すう用配合飼料	5	3	94.7	8.9
	10	3	98.3	4.8
	20	3	104	3.7
ブロイラー前期用配合飼料	5	3	95.7	5.8
	10	3	93.0	5.4
	20	3	94.0	3.8
子豚用配合飼料	5	3	101	8.3
	10	3	94.7	0.6
	20	3	99.3	2.9

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
子豚用配合飼料	7	0	10	98.3	3.3	5.3	0.47

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)相当量を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトン約 50 mL を加える。超音波処理してノシヘプタイドを溶かし、更に標線までアセトン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)相当量を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部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)相当量を含有する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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200

mL の共栓三角フラスコに入れ、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。

抽出液の一部を 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）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

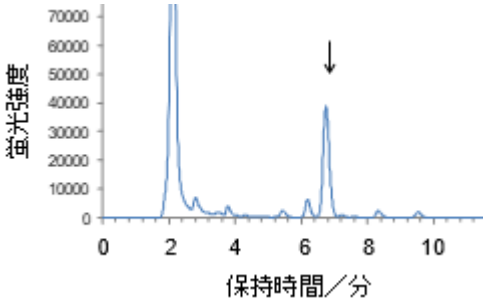
・添加回収率及び繰返し精度

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	2.5	3	94.3	1.6
	5	3	93.2	2.5
	10	3	94.2	1.8
	20	3	97.3	2.3
ほ乳期子豚育成用 人工乳前期用配合飼料	2.5	3	92.7	2.1
	5	3	101	0.44
	10	3	97.7	2.4
	20	3	98.2	1.5
ブロイラー肥育前期用配合飼料	2.5	3	91.4	1.5
	5	3	93.7	1.7
	10	3	94.1	2.6

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
ブロイラー肥育前期用配合飼料	13	1	10	102	3.1	3.8	0.34
ほ乳期子豚育成用人工乳前期用配合飼料	11	3	5	98.4	2.7	2.7	0.21
子豚育成用配合飼料 1	12	2	2.5	99.8	4.3	5.4	0.38
子豚育成用配合飼料 2	13	1	20	101	2.3	2.9	0.28

（参考）クロマトグラム例



添加試料（子豚育成用配合飼料に NH として 2.5 g（力価）/t 相当量添加のクロマトグラム

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、標準原液の一部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 *Kocuria rhizophila* 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　　クロロホルムーメタノールーアンモニア試液[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　　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 0.10 g（0.095~0.104 g）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 g を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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、クロロホルムー酢酸エチル（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）[注2]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、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをクロロホルムー酢酸エチル（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[注3]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　Sep-Pak Plus Silica Cartridge（Waters 製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

3　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_r (%)
成鶏用配合飼料	0.1	3	89.3	1.3
	0.5	3	94.7	2.4
	1	3	104	1.9
肉豚用配合飼料	0.1	3	94.7	1.4
	0.5	3	98.0	5.4
	1	3	103	8.8
乳牛用配合飼料	0.1	3	89.3	2.6
	0.5	3	96.0	5.5
	1	3	106	3.3

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
成鶏用配合飼料	11	0	0.5	109	6.2	7.9	0.45

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	有効試験室数	棄却試験室数	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
成鶏飼育用配合飼料	14	0	0.5	108	8.1	13	0.75

・検出下限（単一試験室による確認）　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約 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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部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) 胞子液及び添加量　試験菌として *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 を用い、1×10^7 個/mL の胞子液を培地 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] 約 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] 約 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 NH_4^+型樹脂を調製する。

別に、イオン交換樹脂約 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。

NH_4^+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　分析試料の一部（HM-B として 200 単位相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、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（Sigma-Aldrich 製）又はこれと同等のもの

2　Amberlite CG50（タイプ I）（Sigma-Aldrich 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_r（%）
幼すう用配合飼料	660	3	91.6	3.1
	1000	3	103	12
	1320	3	94.5	1.5
子豚用配合飼料	660	3	92.9	11
	1000	3	99.3	4.6
	1320	3	96.4	9.2
ほ乳期子豚用配合飼料	660	3	98.3	4.1
	1000	3	94.8	10
	1320	3	96.2	7.3

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（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	0	1000	90.7	4.2	6.8

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部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 *Kocuria rhizophila* 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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部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 を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、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。

ろ液の一部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_r (%)
プレミックス1	1	3	97.5	2.0
	2	3	101	6.7
	5	3	101	1.5
	10	3	93.8	1.3
プレミックス2	1	3	104	5.7
	2	3	97.4	4.5
	5	3	97.6	2.5
	10	3	98.4	2.7
プレミックス3	1	3	96.7	9.0
	2	3	97.1	3.2
	5	3	98.3	2.2
	10	3	95.7	5.9
プレミックス4	1	3	109	5.1
	2	3	96.2	4.5
	5	3	99.9	0.1
	10	3	96.9	0.7

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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 (%)	HorRat
養豚用プレミックス	6	0	1.8	103	2.6	3.4	0.66

21.2　定量試験法（飼料）

21.2.1　平板法

A　試薬等の調製

1) 緩衝液　　2 号緩衝液

2) 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、標準原液の一部を 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。

3) 培　　地　　F-4 号培地

4) 菌液及び添加量　　試験菌として *Kocuria rhizophila* 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) VM が 10 g(力価)/t 以上の場合

分析試料の一部（VM として 160 μg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、

その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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。

ろ液の一部を 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

分析試料の一部（VM として 40 µg(力価)相当量）を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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_r（%）
幼すう用配合飼料	2	6	100	2.3
	4	6	99.7	1.7
	5	6	100	3.3
ブロイラー前期用配合飼料	2	6	98.6	2.0
	4	6	98.0	2.0
	5	6	99.7	2.0
ほ乳期子豚用配合飼料	10	6	101	1.4
	15	6	101	0.9
	20	6	101	1.4
子豚育成用配合飼料	10	6	101	2.0
	15	6	101	1.4
	20	6	101	2.1

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
子豚用配合飼料	5	0	10	99.4	3.8	3.8	0.33

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。