

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、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、標準原液の一部を希釈溶媒で正確に希釈し、100 µg (力価)/mL の高濃度標準液及び 25 µg (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

分析試料の一部（BZM として 10~100 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、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。

ろ液の一部（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 100 µg (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 _r (%)
プレミックス1	0.5	3	92.6	2.0
	2	3	98.7	3.9
	20	3	94.7	3.7
プレミックス2	0.5	3	102	4.9
	2	3	102	1.3
	20	3	98.8	3.7
プレミックス3	0.5	3	99.9	5.1
	2	3	97.1	1.3
	20	3	96.0	0.8

・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
養豚用プレミックス	8	0	2	95.9	2.1	2.6	0.50

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、標準原液の一部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
分析試料の一部（BZM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
分析試料の一部（BZM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、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 _r (%)
幼すう用配合飼料 (非加熱)	5	6	98.9	3.5
	20	6	100	4.4
プロイラー前期用配合飼料 (非加熱)	5	6	98.6	3.3
	20	6	103	4.9
ほ乳期子豚用配合飼料 (非加熱)	5	6	106	1.7
	20	6	100	4.3
ほ乳期子牛用配合飼料 (非加熱)	5	6	107	4.0
	20	6	99.4	3.4

- ・ 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
幼すう用配合飼料 (加熱)	7	0	10	105	2.9	5.0	0.44
幼すう用配合飼料 (非加熱)	7	0	10	104	3.6	4.1	0.37

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 19637 を用い、1×10⁶ 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 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、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	101	2.2
	1	3	99.4	0.7
	2	3	101	1.7
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	100	0.8

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、標準原液の一部を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 *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 0.8 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、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。

ろ液の一部を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 _r (%)
ビタミンプレミックス	0.5	3	101	1.1
	1	3	100	0.9
	2	3	101	1.1
ビタミン・ミネラルプレミックス	0.5	3	101	1.3
	1	3	100	0.8
	2	3	100	0.9

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、標準原液の一部を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 *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。
- 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
分析試料の一部（OM 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 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

分析試料の一部（OM として 20 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 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

分析試料の一部（OM として 8 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 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 _r (%)
幼すう用配合飼料	1	6	95.0	3.4
	2.5	6	98.4	3.1
	5	6	96.8	2.3
ブロイラー前期用配合飼料	1	6	94.1	4.1
	2.5	6	96.6	2.8
	5	6	95.9	2.8
子豚用配合飼料	0.8	6	93.5	4.8
	5	6	96.6	2.8
	40	6	96.9	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
幼すう用配合飼料	7	0	2.5	101	5.8	8.0	0.57

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-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 8.0 g を有効数字3桁まで量り、その数値を記録し、量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、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）^{注1} 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、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 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、希釈溶媒の一部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。

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	98.6	5.9
	5	3	97.0	5.0
	20	3	99.8	2.0
中すう用配合飼料	2.5	3	102	4.5
	5	3	99.9	6.3
	20	3	101	2.8
ブロイラー前期用配合飼料	2.5	3	103	8.8
	5	3	101	10
	20	3	94.1	0.9

・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 (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー前期用配合飼料	8	0	5	100	5.2	5.2	0.42

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

- 緩衝液 4号緩衝液
- 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、標準原液の一部を 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。
- 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。
- 菌液及び添加量 試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 19637 を用い、1×10⁶ 個/mL の孢子液を培地 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

- 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、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。

ろ液の一部を 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 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。

ろ液の一部を 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 _r (%)
ビタミンプレミックス	0.5	3	103	0.4
	1	3	102	1.9
	2	3	100	1.4
ビタミン・ミネラルプレミックス	0.5	3	100	1.8
	1	3	102	1.7
	2	3	102	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、標準原液の一部を 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、1×10⁶ 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（10 mmol/L）（1+1）

B 試料溶液の調製

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、ろ液の一部をアセトン-水（1+1）で正確に希釈し、0.2 µg(力価)/mL のろ液とする。

ろ液の一部を 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 _r (%)
幼う用配合飼料	2	6	92.2	5.8
	5	6	102	3.3
	10	6	102	2.0
	30	6	104	4.1
ブロイラー肥育前期用配合飼料	2	6	95.6	3.1
	5	6	101	2.9
	10	6	102	4.1
	30	6	105	4.7
ほ乳期子豚育成用配合飼料	2	6	96.2	3.6
	5	6	99.5	3.0
	10	6	101	2.0
	30	6	101	3.3
子豚育成用配合飼料	2	6	88.5	4.3
	5	6	97.0	5.0
	10	6	96.9	4.0
	30	6	97.4	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 (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ブロイラー前期用配合飼料	5	0	10	104	5.4	7.5	0.67

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) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 を用い、
1×10⁸ 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)
- 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	20	3	101	2.6
	40	3	101	1.6
	80	3	101	1.7
ビタミン・ミネラルプレミックス	20	3	99.4	1.2
	40	3	100	1.0
	80	3	101	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、標準原液の一部を水-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 spizizenii* 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）
- 6) 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（MN 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、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（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。

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	60	6	99.5	1.3
	80	6	100	1.2
	100	6	100	0.8
中すう用配合飼料	60	6	99.5	1.1
	80	6	100	1.2
	100	6	101	0.9

・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
中すう用配合飼料	4	0	80	100	2.0	2.3	0.28

27.2.2 平板法 (その2)

(適用範囲：牛用飼料^{注1)})

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、標準原液の一部を水-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 spizizenii* 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。
- 4) 寒天平板 円筒法による。
- 5) 抽出溶媒 メタノール-水 (9+1)
- 6) 塩基性アルミナ カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ (粒径 63~200 µm (230~70 メッシュ)) ^{注2} を 130 °C で 2 時間乾燥し、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 (MN として 300 µg(力価)相当量^{注3}) 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。

注 1 夾雑物の影響により回収率が高くなる場合があるため、必要に応じて妥当性を確認すること。

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

3 分析試料の採取量が多くなることにより、抽出溶媒を加えた際に膨潤等によりかき混ぜ抽出が困難な場合、第9章第3節1の1.2の方法を用いる。

(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 (%)
ほ乳期子牛育成用配合飼料 1	15	3	99.1	5.9
	30	3	98.6	2.3
	45	3	105	5.7
ほ乳期子牛育成用配合飼料 2	15	3	104	3.2
	30	3	102	1.9
	45	3	102	2.3
ほ乳期子牛育成用配合飼料 3	15	3	105	2.8
	30	3	103	5.3
	45	3	102	5.2
ほ乳期子牛育成用配合飼料 4	15	3	106	8.3
	30	3	106	6.4
	45	3	104	0.8
ほ乳期子牛育成用配合飼料 5	15	3	91.7	1.8
	30	3	96.4	2.0
	45	3	99.6	4.3
肉用牛肥育用配合飼料1	15	3	109	3.8
	30	3	106	3.0
	45	3	102	4.5
肉用牛肥育用配合飼料2	15	3	108	10
	30	3	111	1.3
	45	3	102	4.1
肉用牛肥育用配合飼料3	15	3	111	4.8
	30	3	110	1.2
	45	3	106	5.5
牛用配合飼料 1 (小麦ストローキューブ12%配合)	22.5	5	109	3.0
	30	5	107	1.7
	45	5	104	2.9
牛用配合飼料 2 (チモシーヘイ・アルファルファヘイミックスキューブ18%配合)	15	5	102	2.9
	22.5	5	109	1.1
	30	5	104	4.5
牛用配合飼料 3 (アルファルファヘイキューブ4%配合)	45	5	105	1.1
	15	5	114	3.1
	22.5	5	108	2.4
牛用配合飼料 4 (アルファルファヘイキューブ14%配合)	30	5	107	1.8
	45	5	107	1.9
	15	5	118	2.1
	22.5	5	103	2.4
	30	5	108	3.7
	45	5	104	0.7

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、標準原液の一部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 spizizenii* 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 _r (%)
プレミックス1	7.5	6	95.6	1.5
	15	6	96.4	1.5
	75	6	99.3	1.6
プレミックス2	7.5	6	96.2	2.7
	15	6	99.1	2.4
	75	6	99.7	1.4
プレミックス3	7.5	6	93.3	3.0
	15	6	97.5	2.7
	75	6	98.8	2.3

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(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
プロイラー用プレミックス	6	0	8	100	2.2	2.3	0.55
プロイラー用プレミックス	6	0	15	102	2.0	2.9	0.79

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、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えて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、標準原液の一部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、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、上澄み液の一部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 C18M 4E (レゾナック製) 又はこれと同等のもの

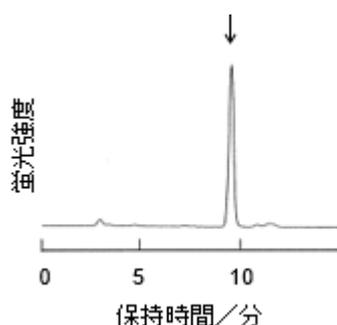
2 リン酸二水素カリウム 2.72 g (2.715~2.724 g) を水に溶かして 1 L とし、リン酸 (1+10) で pH を 2.9~3.1 に調整する。

(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 _r (%)
鶏用プレミックス1	18.25	3	98.5	1.2
	37.5	3	98.9	1.2
	75	3	102	0.2
鶏用プレミックス2	18.25	3	97.0	2.0
	37.5	3	95.8	2.3
	75	3	100	1.9
牛用プレミックス	18.25	3	98.2	1.1
	37.5	3	101	1.4
	75	3	100	0.3

(参考) クロマトグラム例



添加試料 (鶏用プレミックスに LS として 75 g (力価) /kg 相当量添加)
のクロマトグラム

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、標準原液の一部を水-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) 孢子液及び添加量 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) 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 分析試料の一部 (LS として 1 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、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 (2.25~2.75 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。この液の一部を水-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 _r (%)
幼すう育成用配合飼料	75	6	102	2.1
	125	6	99.3	1.7
ブロイラー後期用配合飼料	75	6	98.3	3.6
	125	6	101	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
ブロイラー用配合飼料	7	0	75	101	2.7	3.9	0.47

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、標準原液の一部を水-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 spizizenii* 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 4.0 g (3.95~4.04 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、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) ^{注1} 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、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。

ろ液の一部を水-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。

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 (%)
肉用牛肥育用配合飼料1	33	3	101	0.9
肉用牛肥育用配合飼料2	33	3	98.9	3.5

・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
肉用牛肥育用配合飼料	11	0	33	95.7	3.5	5.3	0.56

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 (2.45~2.54 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 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、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 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、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

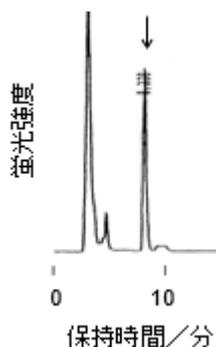
・添加回収率及び繰返し精度

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 _r (%)
幼すう育成用配合飼料1 (非加熱)	37.5	3	97.3	5.2
	75	3	98.3	4.7
	112.5	3	99.7	3.9
幼すう育成用配合飼料2 (非加熱)	37.5	3	100	1.6
	75	3	95.6	5.5
	112.5	3	99.1	1.5
ブロイラー肥育前期用配合飼料 (非加熱)	37.5	3	103	2.0
	75	3	98.8	4.9
	112.5	3	99.1	1.5
幼すう育成用配合飼料 (加熱)	37.5	3	104	3.4
	75	3	107	2.9
	112.5	3	105	4.0

・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 (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
幼すう育成用配合飼料 (加熱)	6	0	75	106	1.7	3.4	0.41
幼すう育成用配合飼料 (非加熱)	6	0	75	96.9	1.6	2.0	0.24

(参考) クロマトグラム例



添加試料 (幼すう育成用配合飼料 (非加熱)) に LS として
75 g (力価) / t 相当量添加) のクロマトグラム

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 以上を有効数字3桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部を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 spizizenii* 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 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。

ろ液の一部を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 _r (%)
ビタミンプレミックス	2	3	101	2.2
	5	3	99.2	1.2
	10	3	98.8	0.4
ビタミン・ミネラルプレミックス	2	3	98.5	0.8
	5	3	101	1.6
	10	3	99.9	1.1

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 以上を有効数字3桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部を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、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。

ろ液の一部を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 _r (%)
プレミックス1	0.5	3	96.4	3.3
	2	3	102	0.7
	10	3	100	1.1
プレミックス2	0.5	3	105	2.2
	2	3	101	3.8
	10	3	96.7	4.7
プレミックス3	0.5	3	99.9	5.1
	2	3	95.9	1.8
	10	3	95.6	1.8

- ・ 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
プレミックス	6	0	2	95.1	3.6	4.1	0.79

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-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

分析試料の一部（CL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、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

分析試料の一部（CL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、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 (%)
硫酸コリスチン (精製級)	幼すう育成用配合飼料	2	3	99.2	3.5
		20	3	99.0	1.3
		40	3	98.2	3.5
	中すう育成用配合飼料	2	3	100	1.4
		20	3	100	1.1
		40	3	100	2.5
	大すう育成用配合飼料	2	3	102	1.4
		20	3	101	2.8
		40	3	97.8	0.6
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	2	3	99.3	1.6
		20	3	98.1	1.7
		40	3	99.6	2.0
	子豚育成用配合飼料	2	3	100	2.3
		20	3	98.5	2.0
		40	3	99.2	2.0
硫酸コリスチン (飼料級)	幼すう育成用配合飼料	2	3	99.2	3.5
		20	3	98.1	1.2
		40	3	98.7	1.2
	中すう育成用配合飼料	2	3	98.1	3.5
		20	3	98.1	1.2
		40	3	99.7	2.0
	大すう育成用配合飼料	2	3	99.4	2.4
		20	3	97.2	2.4
		40	3	99.1	2.3
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	2	3	98.0	3.5
		20	3	98.7	2.8
		40	3	97.4	3.1
	子豚育成用配合飼料	2	3	99.1	2.4
		20	3	98.5	2.0
		40	3	98.0	1.8

・ 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 (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
幼すう用配合飼料	4	0	10	105	6.9	6.9	0.61

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 以上を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、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、標準原液の一部を 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) 孢子液及び添加量 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 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。

ろ液の一部を 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 _r (%)
ビタミンプレミックス	2	3	99.7	2.1
	5	3	99.9	1.9
	10	3	101	1.9
ビタミン・ミネラルプレミックス	2	3	99.9	1.9
	5	3	101	1.3
	10	3	98.6	0.3

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、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、標準原液の一部を 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 *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。
- 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、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。

ろ液の一部を 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 _r (%)
ビタミンプレミックス	2	3	98.2	0.7
	5	3	99.9	0.1
	10	3	98.2	0.7
ビタミン・ミネラルプレミックス	2	3	96.8	0.5
	5	3	99.5	0.8
	10	3	98.2	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、標準原液の一部を 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 *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 0.1 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

分析試料の一部（TS 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、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。

ろ液の一部を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

分析試料の一部（TS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、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。

ろ液の一部を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

分析試料の一部（TS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、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 _r (%)
幼すう用配合飼料	4.4	6	98.7	2.7
	8.8	6	99.0	1.8
	22	6	101	1.1
中すう用配合飼料	4.4	6	99.4	2.8
	8.8	6	101	1.2
	22	6	99.3	1.7
ほ乳期子豚用配合飼料	22	6	99.7	1.6
	44	6	100	1.6
	88	6	100	0.8

・ 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 (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ほ乳期子豚用配合飼料	5	0	88	101	4.8	5.0	0.61

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、標準原液の一部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 *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 %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 0.1 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、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（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、標準原液の一部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 *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 %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

分析試料の一部 (TS 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、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、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えて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 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、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えて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 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、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えて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 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、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えて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 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-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。ろ液の一部をメタノール-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 (14.5~15.4 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 °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。

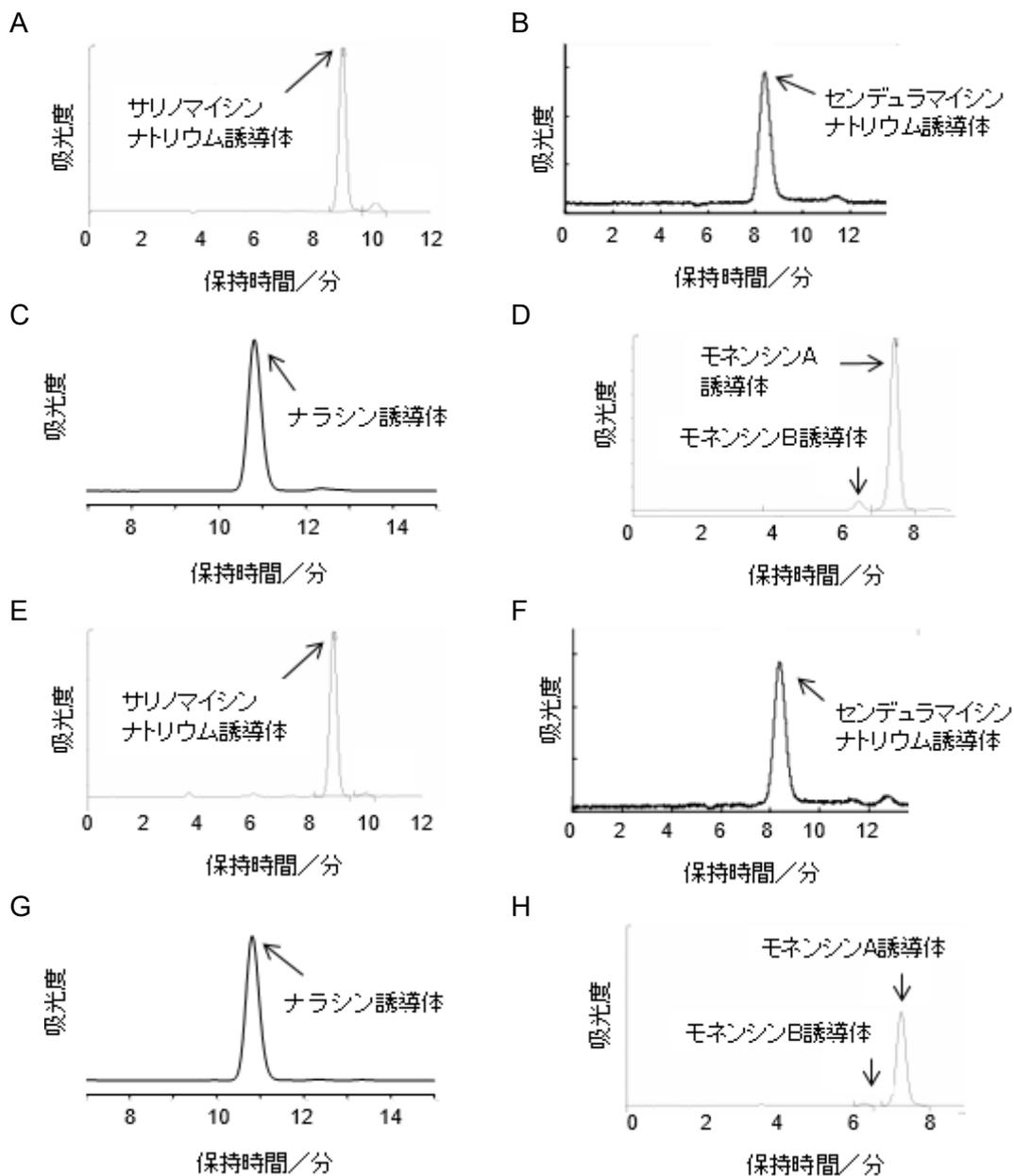
- 3 モネンシンナトリウムについては、算出したモネンシン A 量をモネンシンナトリウム量とする。なお、各モネンシンナトリウム標準液のクロマトグラムに現れる主要なピークが、モネンシン A である。また、試料溶液のクロマトグラムにおいては、標準液のモネンシン A と同じ保持時間に現れるピークがモネンシン A である。
- 4 ナラシンについては、算出したナラシン A 量をナラシン量とする。なお、各ナラシン標準液のクロマトグラムに現れる主要なピークが、ナラシン A である。また、試料溶液のクロマトグラムにおいては、標準液のナラシン A と同じ保持時間に現れるピークがナラシン A である。

(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 (%)
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	3	102	0.6
		50	3	99.3	3.8
		85	3	100	1.7
	ブロイラー肥育後期用 プレミックス	12.5	3	103	0.8
		50	3	102	3.0
		85	3	96.3	1.8
	肉用牛肥育用プレミックス	12.5	3	101	0.9
		50	3	98.0	1.6
		85	3	98.1	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	3	102	0.5
		25	3	99.8	2.4
		42	3	101	1.5
	鶏用プレミックス2	8	3	98.5	2.8
		25	3	100	0.9
		42	3	102	2.8
	鶏用プレミックス3	8	3	98.2	0.7
		25	3	101	0.4
		42	3	100	2.7
ナラシン	鶏用プレミックス1	8	3	104	0.9
		40	3	99.1	0.3
		80	3	98.7	0.7
	鶏用プレミックス2	8	3	96.0	0.2
		40	3	99.1	0.8
		80	3	99.4	0.5
	鶏用プレミックス3	8	3	96.6	0.1
		40	3	99.8	0.4
		80	3	97.2	0.5
	鶏用プレミックス4	2.5	5	93.4	4.7
		25	5	95.1	1.0
		50	5	97.9	2.4
	鶏用プレミックス5	2.5	5	103	4.9
		25	5	98.9	3.2
		50	5	99.8	2.0
	鶏用プレミックス6	2.5	5	101	3.6
		25	5	103	3.3
		50	5	99.6	2.6
モネンシンナト リウム	幼すう育成用プレミックス	5	3	98.2	0.8
		33	3	101	2.1
		80	3	102	1.0
	ブロイラー肥育後期用 プレミックス	5	3	103	1.9
		33	3	101	2.0
		80	3	103	0.5
	肉用牛肥育用プレミックス	5	3	99.5	1.1
		33	3	96.6	4.7
		80	3	96.6	1.0

(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,B,C,D : 標準液 (各抗生物質として 200 ng(力価)注入)

E : 添加試料 (鶏用プレミックスに SL として 50 g(力価)/kg 相当量添加)

F : 添加試料 (鶏用プレミックスに SD として 25 g(力価)/kg 相当量添加)

G : 添加試料 (鶏用プレミックスに NR として 80 g(力価)/kg 相当量添加)

H : 添加試料 (幼すう育成用プレミックスに MN として 33.3 g(力価)/kg 相当量
添加)

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、標準原液の一部をメタノール-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 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、標準原液の一部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)相当量を含有する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、標準原液の一部をメタノール-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 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、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 (%)
サリノマイシン ナトリウム	幼すう育成用配合飼料	25	3	96.7	4.6
		50	3	102	2.1
		75	3	99.7	3.8
	ブロイラー肥育前期用 配合飼料	25	3	96.0	1.7
		50	3	98.7	2.1
		75	3	98.7	1.5
	ブロイラー肥育後期用 配合飼料	25	3	101	1.5
		50	3	97.7	4.0
		75	3	98.7	1.2
	幼令牛育成用配合飼料	7.5	3	99.7	2.3
		15	3	101	1.5
		22.5	3	97.0	4.6
	肉用牛肥育前期用配合 飼料	7.5	3	103	2.5
		15	3	98.3	4.6
		22.5	3	101	4.0
	肉用牛肥育後期用配合 飼料	7.5	3	103	4.0
		15	3	97.7	3.5
		22.5	3	99.3	3.2
センデュラマイ シンナトリウム	幼すう育成用配合飼料	12.5	3	97.8	0.8
		25	3	97.8	0.9
		37.5	3	95.6	1.3
	ブロイラー肥育前期用 配合飼料	12.5	3	98.1	1.9
		25	3	98.7	1.6
		37.5	3	97.5	0.9
	ブロイラー肥育後期用 配合飼料	12.5	3	98.3	1.3
		25	3	98.3	1.5
		37.5	3	97.7	0.3
ナラシン	幼すう育成用配合飼料	40	3	99.0	2.7
		80	3	97.8	2.1
		120	3	102	1.3
	ブロイラー肥育前期用 配合飼料1	40	3	99.4	1.7
		80	3	103	2.7
		120	3	102	1.3
	ブロイラー肥育後期用 配合飼料1	40	3	96.3	0.6
		80	3	99.8	0.3
		120	3	97.5	1.9
	ブロイラー肥育前期用 配合飼料2	25	5	98.1	7.0
		50	5	96.9	6.5
		75	5	98.3	2.1
	ブロイラー肥育前期用 配合飼料3	25	5	107	3.7
		50	5	96.1	4.9
		75	5	95.0	3.6
ブロイラー肥育後期用 配合飼料2	25	5	93.9	5.3	
	50	5	102	2.8	
	75	5	96.5	5.9	

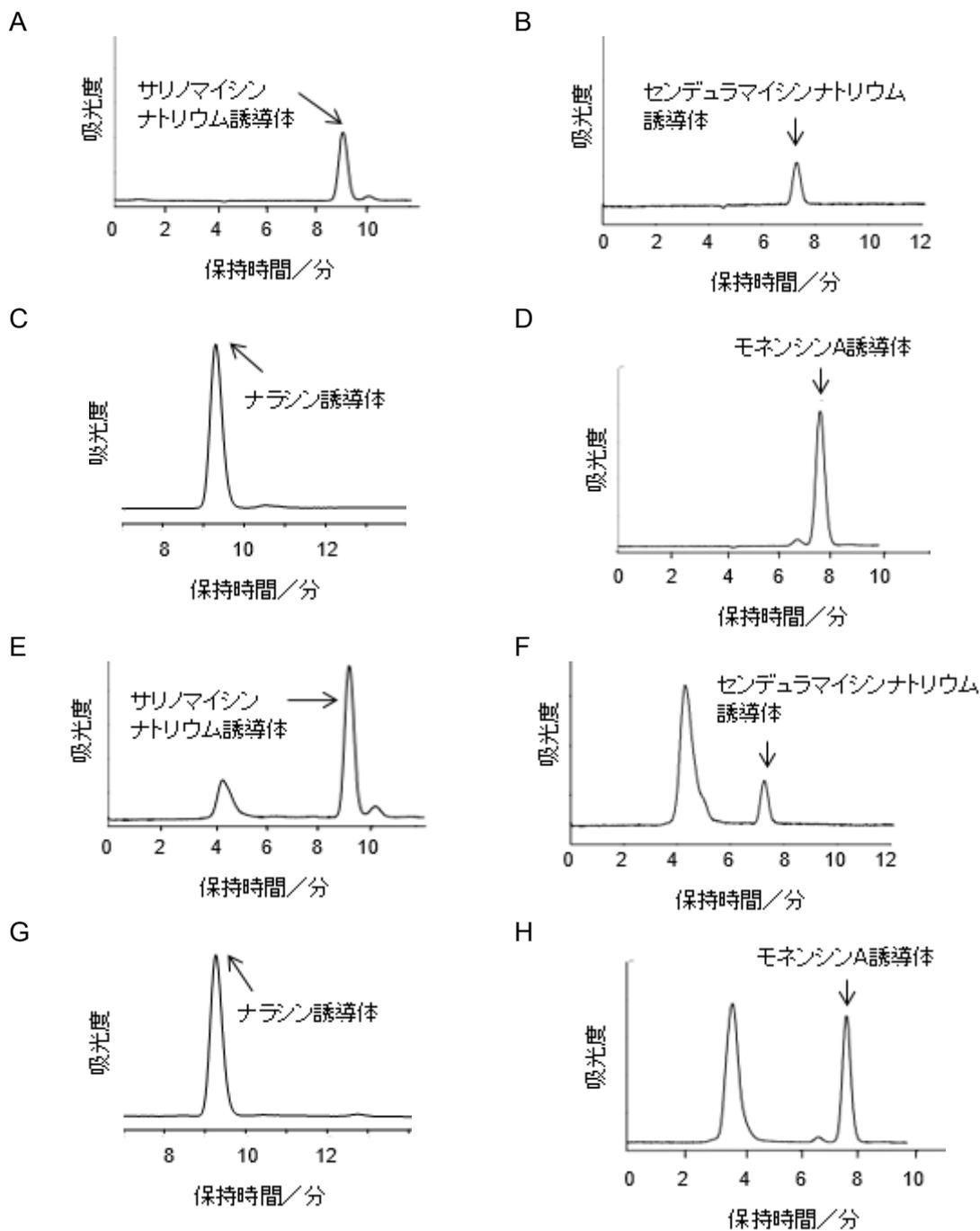
・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

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 (%)
モネンシンナトリウム	幼すう育成用配合飼料	40	3	100	0.6
		80	3	99.0	1.0
		120	3	99.7	0.6
	ブロイラー肥育前期用配合飼料	40	3	99.3	1.2
		80	3	99.7	0.6
		120	3	99.3	0.6
	ブロイラー肥育後期用配合飼料	40	3	99.3	0.6
		80	3	98.7	0.6
		120	3	100	1.0
	ほ乳期子牛育成用配合飼料1	15	3	97.4	2.2
		30	3	98.2	1.2
		45	3	96.0	1.0
	ほ乳期子牛育成用配合飼料2	15	3	94.9	1.8
		30	3	97.7	2.3
		45	3	95.3	1.0
	ほ乳期子牛育成用配合飼料3	15	3	93.3	0.9
		30	3	95.4	0.9
		45	3	96.5	2.7
	ほ乳期子牛育成用配合飼料4	15	3	94.9	1.0
		30	3	96.9	1.4
		45	3	96.9	0.5
	ほ乳期子牛育成用配合飼料5	15	3	95.1	1.9
		30	3	93.8	1.3
		45	3	96.1	1.2
	幼令牛育成用配合飼料	15	3	102	1.0
		30	3	100	1.2
		45	3	100	0.6
	肉用牛肥育前期用配合飼料	15	3	99.3	1.5
		30	3	98.0	1.7
		45	3	99.7	1.2
肉用牛肥育後期用配合飼料	15	3	101	1.5	
	30	3	101	1.7	
	45	3	102	1.0	
牛用配合飼料 1 (小麦ストローキューブ12%配合)	15	5	103	3.0	
	30	5	102	2.0	
	45	5	105	1.2	
牛用配合飼料 2 (チモシーヘイ・アルファルファヘイミックスキューブ18%配合)	15	5	106	2.1	
	30	5	101	1.0	
	45	5	106	2.0	
牛用配合飼料 3 (アルファルファヘイキューブ4%配合)	15	5	105	0.8	
	30	5	103	0.7	
	45	5	103	2.0	
牛用配合飼料 4 (アルファルファヘイキューブ14%配合)	15	5	98.6	2.1	
	30	5	99.1	2.1	
	45	5	102	1.4	

・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
サリノマイシン ナトリウム	鶏用配合飼料	7	0	50	94.4	2.7	3.0	0.33
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	0	25	97.9	1.8	2.2	0.22
ナラシン	幼すう育成用 配合飼料	7	0	80	99.6	2.9	3.2	0.39
モネンシン ナトリウム	牛用配合飼料	6	0	30	98.0	2.0	3.0	0.31

(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,B,C,D : 標準液 (SLとして40 ng(力価)、SDとして50 ng(力価)、NRとして160 ng(力価)及びMNとして30 ng(力価)注入)

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

F : 添加試料 (ブロイラー肥育後期用配合飼料にSDとして25 g(力価)/t相当量添加)

G : 添加試料 (幼すう育成用配合飼料にNRとして80 g(力価)/t相当量添加)

H : 添加試料 (幼令牛育成用配合飼料にMNとして30 g(力価)/t相当量添加)

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、更にメタノールを正確に加えて 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、標準原液の一部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 *Kocuria rhizophila* 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、デシケーター中で放冷する。

- 8) 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-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1} 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-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2} 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 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。

(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 (%)	
キタサマイシン	成鶏用配合飼料	0.1	3	106	6.5	
		0.5	3	100	4.0	
		1	3	97.7	2.6	
	肉豚用配合飼料	0.1	3	113	13	
		0.5	3	109	7.6	
		1	3	105	8.5	
	乳用牛用配合飼料	0.1	3	102	6.5	
		0.5	3	100	4.0	
		1	3	107	8.0	
バージニアマイシン	成鶏用配合飼料	0.1	3	106	6.5	
		0.5	3	96.0	9.1	
		1	3	101	5.7	
	肉豚用配合飼料	0.1	3	110	9.1	
		0.5	3	94.7	6.8	
		1	3	101	7.5	
	乳用牛用配合飼料	0.1	3	102	6.5	
		0.5	3	100	2.0	
		1	3	101	3.0	
	リン酸タイロシン	成鶏用配合飼料	0.1	3	106	6.5
			0.5	3	101	4.6
			1	3	104	3.8
肉豚用配合飼料		0.1	3	97.7	2.6	
		0.5	3	100	4.0	
		1	3	107	9.8	
乳用牛用配合飼料		0.1	3	98.0	2.7	
		0.5	3	98.7	6.2	
		1	3	98.0	2.0	

・検出下限 (単一試験室による確認) 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、標準原液の一部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、標準原液の一部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 spizizenii* 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、デシケーター中で冷却する。

- 8) 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-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1} 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-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2}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 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。

(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 (%)
サリノマイシン ナトリウム	成鶏用配合飼料	0.1	3	110	0.0
		0.5	3	102	7.1
		1	3	107	8.9
	肉豚用配合飼料	0.1	3	120	8.3
		0.5	3	107	7.1
		1	3	107	4.3
	乳用牛用配合飼料	0.1	3	117	9.9
		0.5	3	105	4.8
		1	3	105	7.7
モネンシン ナトリウム	成鶏用配合飼料	0.1	3	107	5.4
		0.5	3	97.3	3.1
		1	3	103	4.5
	肉豚用配合飼料	0.1	3	106	11
		0.5	3	99.3	1.2
		1	3	101	3.0
	乳用牛用配合飼料	0.1	3	110	0
		0.5	3	98.7	1.2
		1	3	102	5.2
ラサロシド ナトリウム	成鶏用配合飼料	0.1	3	116	19
		0.5	3	94.0	7.4
		1	3	97.3	1.2
	肉豚用配合飼料	0.1	3	112	22
		0.5	3	91.3	1.3
		1	3	103	4.9
	乳用牛用配合飼料	0.1	3	112	22
		0.5	3	94.7	10
		1	3	104	5.8

・ 検出下限 (単一試験室による確認) 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)相当量を有効数字 3 桁まで量り、その数値を記録し、それぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えて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 200 µg (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部を混合し、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 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 25 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) ^{注2} 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 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

メタノール 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

(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 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm) ^{注3}
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

(質量分析計部^{註4)})

検出器：四重極型質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード)

ネブライザーガス：N₂ (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)、891 (センデュラマイシン)、783 (ナラシン A)、688 (モネンシン A)、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^{註5}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 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 Gemini 5 μ C18 110A (Phenomenex 製) 又はこれと同等のもの

4 LCMS-2010EV (島津製作所製) による条件例

5 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 (%)
サリノマイシン ナトリウム	成鶏飼育用配合飼料	0.5	3	95.0	2.4
		5	3	96.2	1.9
	肉豚肥育用配合飼料	0.5	3	95.5	2.3
		5	3	98.4	2.0
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5	3	89.7	2.9
		5	3	98.8	1.3
センジュラマイ シンナトリウム	成鶏飼育用配合飼料	0.5	3	89.4	1.2
		5	3	89.5	0.7
	肉豚肥育用配合飼料	0.5	3	80.0	10
		5	3	84.6	0.9
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5	3	90.0	3.9
		5	3	88.7	1.4
ナラシン	成鶏飼育用配合飼料	0.5	3	88.9	7.6
		5	3	86.8	1.6
	肉豚肥育用配合飼料	0.5	3	83.0	6.6
		5	3	88.3	2.3
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5	3	83.4	13
		5	3	89.7	3.6

・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

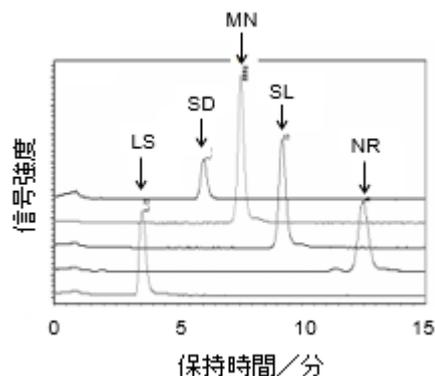
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
モネンシン ナトリウム	成鶏飼育用配合飼料	0.5	3	109	1.1
		5	3	104	1.5
	肉豚肥育用配合飼料	0.5	3	104	0.9
		5	3	105	0.8
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5	3	104	0.5
		5	3	108	1.1
ラサロシド ナトリウム	成鶏飼育用配合飼料	0.5	3	94.5	2.1
		5	3	91.6	2.8
	肉豚肥育用配合飼料	0.5	3	86.0	4.5
		5	3	91.4	1.4
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5	3	89.4	2.1
		5	3	85.2	3.8

・共同試験

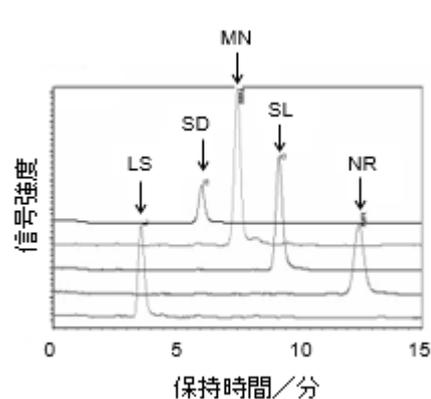
成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
サリノマイシン ナトリウム	成鶏飼育用 配合飼料	8	0	0.5	95.0	2.7	6.4	0.36
センデュラマイ シンナトリウム	成鶏飼育用 配合飼料	8	0	0.5	98.6	2.6	8.0	0.45
ナラシン	成鶏飼育用 配合飼料	8	0	0.5	88.5	3.5	5.7	0.31
モネンシン ナトリウム	成鶏飼育用 配合飼料	8	0	0.5	101	3.6	5.0	0.28
ラサロシド ナトリウム	成鶏飼育用 配合飼料	8	0	0.5	93.3	3.8	8.2	0.46

- ・検出下限（単一試験室による確認） 試料中 0.5 g(力価)/t
 (参考) クロマトグラム例

A



B



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（各抗生物質として 0.12 µg/mL）

B：添加試料（成鶏飼育用配合飼料に各抗生物質として 0.5 g(力価)/t 相当量添加）

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) 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。
- 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。
- 4) 培地 F-22号培地
- 5) 孢子液及び添加量 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 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、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

分析試料の一部 (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 50 mL (LS にあつてはクロロホルム 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。