

22 ビコザマイシン

22.1 定量試験法（プレミックス）

22.1.1 平板法

A 試薬等の調製

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

B 試料溶液の調製

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

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

C 定 量

2-2 用量法による。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

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

・共同試験

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

22.2 定量試験法（飼料）

22.2.1 平板法

A 試薬等の調製

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

B 試料溶液の調製

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

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

C 定 量

標準曲線法による。

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度

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

- ・ 共同試験

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

23 フラボフォスフォリポール

23.1 定量試験法 (プレミックス)

23.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 7号緩衝液
- 2) フラボフォスフォリポール標準液 常用標準フラボフォスフォリポール 40 mg 以上を正確に量り、メタノール-水 (1+1) を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のフラボフォスフォリポール標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量を 7 号緩衝液で正確に希釈し、2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製する。
- 3) 培地 F-12 号培地
使用に際して、メチレンブルー試液及びホウ酸溶液 (4 w/v%) を培地 100 mL に対してそれぞれ 1 mL 加える。
- 4) 胞子液及び添加量 試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 19637 を用い、1×10⁶ 個/mL の胞子液を培地 100 mL に対して 0.2 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

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

抽出した後、抽出液をろ紙（5種A）でろ過する。

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

2) 分析試料にSL又はMNを含む場合

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

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

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

C 定 量

2-2 用量法による。

ただし、各寒天平板は、27~29 °Cで16~24時間培養する。

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

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

24 ポリスチレンスルホン酸オレアンドマイシン

24.1 定量試験法（プレミックス）

24.1.1 平板法

A 試薬等の調製

1) 緩衝液

i) 4号緩衝液

ii) 9号緩衝液

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

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

3) 培 地 F-7号培地

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

5) 寒天平板 せん孔法による。

B 試料溶液の調製

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

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

C 定 量

2-2 用量法による。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

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

24.2 定量試験法（飼料）

24.2.1 平板法

A 試薬等の調製

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

B 試料溶液の調製

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

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

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

3) OM が 2 g(力価)/t 未満の場合

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

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

C 定 量

標準曲線法による。

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度

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

- ・ 共同試験

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

25 ポリナクチン

25.1 定量試験法（飼料）

25.1.1 平板法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 4 号緩衝液
- 2) 希釈溶媒 ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイン酸エステル 2 mL を 4 号緩衝液-メタノール (4+1) 1,000 mL に溶かし、希釈溶媒とする。
- 3) ポリナクチン標準液 常用標準ポリナクチン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、アセトンを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、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、1.6 µg(力価)/mL、0.8 µg(力価)/mL、0.4 µg(力価)/mL、0.2 µg(力価)/mL 及び 0.1 µg(力

価)/mL の各標準液を調製する。

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

B 試料溶液の調製

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

精製 試料溶液 25 mL を 100 mL の共栓遠心沈殿管に正確に入れ、アセトニトリル飽和ヘキサン 25 mL を加えて 1 分間振り混ぜた後、1,500×g で 5 分間遠心分離する。アセトニトリル層 (下層) 20 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C の水浴で減圧乾固した後、クロロホルム 10 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とする。

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

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

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

C 定 量

標準曲線法による。

ただし、各寒天平板は、29~31 °C で 20~24 時間培養する。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

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

・共同試験

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

26 マカルボマイシン

26.1 定量試験法（プレミックス）

26.1.1 平板法

A 試薬等の調製

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

B 試料溶液の調製

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

C 定 量

2-2 用量法による。

ただし、各寒天平板は、27~29 °C で 16~24 時間培養する。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

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

26.2 定量試験法 (飼料)

26.2.1 平板法

A 試薬等の調製

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

B 試料溶液の調製

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

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

C 定 量

標準曲線法による。

ただし、各寒天平板は、27~29 °C で 16~24 時間培養する。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

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

・共同試験

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

27 モネンシンナトリウム

27.1 定量試験法（プレミックス）

27.1.1 平板法

A 試薬等の調製

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

B 試料溶液の調製

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

C 定 量

2-2 用量法による。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

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

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

27.2 定量試験法 (飼料)

27.2.1 平板法 (その1)

(適用範囲: 鶏用飼料)

A 試薬等の調製

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

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

- 2) 培地 F-16 号培地

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

- 4) 寒天平板 円筒法による。

- 5) 抽出溶媒 メタノール-水 (9+1)

B 試料溶液の調製

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

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

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

C 定 量

2-2 用量法による。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

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

・共同試験

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

27.2.2 平板法 (その2)

(適用範囲: 牛用飼料)

A 試薬等の調製

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

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

- 2) 培地 F-22 号培地

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

- 4) 寒天平板 円筒法による。

- 5) 抽出溶媒 メタノール-水 (9+1)

B 試料溶液の調製

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

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

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

C 定 量

2-2 用量法による。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

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

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

27.3 微量定量試験法

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

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

27.4 確認試験法 (プレミックス)

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

27.5 確認試験法 (飼料)

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

28 ラサロシドナトリウム

28.1 定量試験法 (プレミックス)

28.1.1 平板法

A 試薬等の調製

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

- 3) 培地 F-18号培地
- 4) 胞子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^9 個/mL の胞子液を培地 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

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

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

C 定 量

2-2 用量法による。

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度

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

- ・ 共同試験

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

28.1.2 液体クロマトグラフ法

A 試薬の調製

ラサロシドナトリウム標準液 常用標準ラサロシド 50 mg(力価)相当量を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてラサロシドナトリウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、ラサロシドナトリウムとして 0.5 mg(力価)相当量を含有する。）。

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

B 定 量

抽出 試料 2~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一定量をメタノールで正確に希釈する。更にこの液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各ラサロシドナトリウム標準液各 20

μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器（励起波長：310 nm、蛍光波長：420 nm）
カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm）^{注1}
溶 離 液：メタノールーリン酸緩衝液^{注2}（9+1）
流 速：1.0 mL/min
カラム槽温度：40 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のラサロシドナトリウム量を算出する。

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

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

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g(力価)/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
鶏用プレミックス1	18.25~75	3	98.5~101.5	1.2
鶏用プレミックス2	18.25~75	3	95.8~100.1	2.6
牛用プレミックス	18.25~75	3	98.2~100.8	1.4

28.2 定量試験法（飼料）

28.2.1 平板法（その1）

（適用範囲：鶏用）

A 試薬等の調製

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

B 試料溶液の調製

抽 出 分析試料の一定量（LS として 1 mg(力価)相当量）を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、クロロホルム 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。ろ液 25 mL を 50 mL の共栓試験管に入れ、硫酸ナトリウム（無水）で脱水した後、ろ紙（5 種

A) でろ過し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 シリカゲル 2.5 g をメタノールに懸濁させてカラム管（内径 10 mm）に流し込み、メタノール 20 mL 及びクロロホルム 50 mL で順次洗浄してカラムを調製する。

試料溶液 5 mL をカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流速 2~3 mL/min で流出させた後、クロロホルム 30 mL を加え、同様に流出させる。

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

C 定 量

2-2 用量法による。

注 1 Silica gel 40 (Merck 製) 又はこれと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
幼おう育成用配合飼料	75~125	6	99.3~102.3	2.1
プロイラー後期用配合飼料	75~125	6	98.3~100.7	3.6

- ・共同試験

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

28.2.2 平板法（その 2）

（適用範囲：牛用）

A 試薬等の調製

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

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

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

B 試料溶液の調製

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

精製 試料溶液 25 mL を 200 mL の分液漏斗に正確に入れ、水 25 mL を加え、更にヘキサン 50 mL を加えて 10 分間振り混ぜた後静置する。ヘキサン層（上層）を 200 mL のなす形フラスコに入れ、残留液にヘキサン 50 mL を加えて 1 分間振り混ぜ、ヘキサン層を先のなす形フラスコに合わせる。更に残留液にヘキサン 50 mL を加えて同様に操作する。ヘキサン層を 50 °C の水浴で減圧乾固した後、ヘキサン 10 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 シリカゲルミニカラム（690 mg）をヘキサン 10 mL で洗浄する。

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

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

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

C 定 量

2-2 用量法による。

（参考）分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度

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

- ・ 共同試験

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

28.2.3 液体クロマトグラフ法

（適用範囲：鶏用）

A 試薬の調製

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

B 定 量

抽 出

- 1) 分析試料がペレット状等加熱加工した飼料の場合

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、酵素溶液 20 mL を加え、よく混和した後、40 °C の水浴上で 20 分間静置する。更にメタノール 80 mL をこの液に加え、10 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

- 2) 分析試料がペレット状等加熱加工した飼料以外の場合

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 28.1.2 の B の液体クロマトグラフィーの項による。

計 算 28.1.2 の B の計算の項による。

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度

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

- ・ 共同試験

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

28.3 微量定量試験法

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

(適用範囲：飼料)

第 3 節 3 による。

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

第3節4による。

28.4 確認試験法（プレミックス）

28.4.1 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる確認試験法

第3節5.1による。

28.5 確認試験法（飼料）

28.5.1 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる確認試験法

第3節5.2による。

29 硫酸カナマイシン

29.1 定量試験法（プレミックス）

29.1.1 平板法

A 試薬等の調製

1) 緩衝液

i) 2号緩衝液

ii) 4号緩衝液

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

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

3) 培地 F-3号培地

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

5) 寒天平板 せん孔法による。

6) 抽出溶媒 水-アセトン-塩酸 (51+40+9)

B 試料溶液の調製

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

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

C 定 量

2-2 用量法による。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

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

30 硫酸コリスチン

30.1 定量試験法 (プレミックス)

30.1.1 平板法

A 試薬等の調製

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

B 試料溶液の調製

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

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

C 定 量

2-2 用量法による。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

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

・共同試験

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

30.2 定量試験法（飼料）

30.2.1 平板法

A 試薬等の調製

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

B 試料溶液の調製

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

アセトン層（下層）をろ紙（5種A）でろ過する。

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

C 定 量

標準曲線法による。

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

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

・ 共同試験

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

31 硫酸フラジオマイシン

31.1 定量試験法（プレミックス）

31.1.1 平板法

A 試薬等の調製

1) 緩衝液

i) 4号緩衝液

ii) 6号緩衝液

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

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

3) 培地 F-24号培地

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

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

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

B 試料溶液の調製

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

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

C 定 量

2-2 用量法による。

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度

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

32 リン酸タイロシン

32.1 定量試験法 (プレミックス)

32.1.1 平板法

A 試薬等の調製

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

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

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

B 試料溶液の調製

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

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

及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度試料溶液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

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

32.2 定量試験法 (飼料)

32.2.1 平板法

A 試薬等の調製

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

B 試料溶液の調製

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

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

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

C 定 量

標準曲線法による。

(参考) 分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度

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

- ・共同試験

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

32.3 微量定量試験法

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

(適用範囲：飼料)

第 3 節 2 による。

32.4 確認試験法（プレミックス）

32.4.1 バイオオートグラフ法

A 試薬等の調製

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

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

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

B 試料溶液の調製

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

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

C 同 定

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

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

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

32.5 確認試験法（飼料）

32.5.1 バイオオートグラフ法

A 試薬等の調製

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

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

2) 培 地 F-111 号培地

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

4) 展開溶媒 アセトニトリル-メタノール（17+3）

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

B 試料溶液の調製

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

C 同 定

32.4.1 の C による。

ただし、標準液及び試料溶液各 50 µL をスポットする。