第 10 章　ビタミン

1　L-アスコルビン酸又は L-アスコルビン酸カルシウム
（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

1)　抽出溶媒　L-システイン塩酸塩一水和物 20.0 g（19.95~20.04 g）をメタリン酸溶液（5 w/v%）に溶かして 1 L とする（使用時に調製する。）。

2)　L-アスコルビン酸標準液　L-アスコルビン酸〔$C_6H_8O_6$〕5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタリン酸溶液（5 w/v%）を加えて溶かし、更に標線までメタリン酸溶液（5 w/v%）を加えて L-アスコルビン酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、L-アスコルビン酸として 50 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL 中に L-アスコルビン酸として 0.05~0.3 mg を含有する数点の L-アスコルビン酸標準液を調製する。

B　定　量

抽　出　分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、10 分間かき混ぜて抽出する。抽出液の上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過した後 2 時間静置し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

測　定　試料溶液及び各 L-アスコルビン酸標準液各 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：244 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 3.9 mm、長さ 300 mm、粒径 10 μm）[注 1]

溶　離　液：硫酸水素テトラブチルアンモニウム 0.68 g（0.675~0.684 g）及び酢酸ナトリウム三水和物 1.36 g（1.355~1.364 g）を水に溶かして 1 L とし、酢酸で pH を 4.8 に調整する。

流　　速：1.0 mL/min

計　算　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中の L-アスコルビン酸量を算出する。

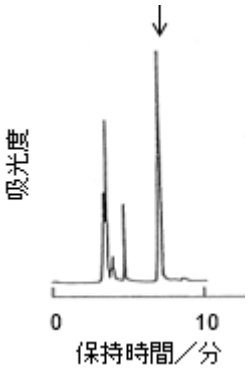
注 1　μBondapak C_{18}（Waters 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度（%）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
鶏用プレミックス	0.1	3	98.7	4.0
	2	3	96.5	4.9
	10	3	98.8	1.8
豚用プレミックス	0.1	3	98.2	1.0
	2	3	99.2	3.4
	10	3	100	1.5
魚用プレミックス	0.1	3	97.9	3.8
	2	3	95.8	1.1
	10	3	94.4	1.6

（参考）クロマトグラム例



L−アスコルビン酸のクロマトグラム

2　アセトメナフトン

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

アセトメナフトン標準液　アセトメナフトン〔$C_{15}H_{14}O_4$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてアセトメナフトン標準原液を調製する[注 1]（この液 1 mL は、アセトメナフトンとして 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にアセトメナフトンとして 2.5~10 μg を含有する数点のアセトメナフトン標準液を調製する[注 1]。

B　定　量

抽　出　分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、15 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、650×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　試料溶液及び各アセトメナフトン標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件　例

検　出　器：紫外吸光光度検出器（測定波長：225 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm）注 2

溶　離　液：メタノール－水（3+2）

流　　速：0.7 mL/min

計　　算　　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のアセトメナフトン量を算出する。

注 1　使用時に調製すること。

2　UNISIL PACK $5C_{18}$（ジーエルサイエンス製（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

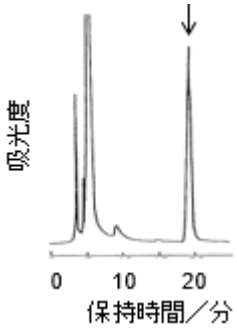
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
鶏用プレミックス	0.1	3	101	1.1
	0.5	3	99.6	4.7
	2	3	99.0	3.6
豚用プレミックス	0.1	3	97.5	3.1
	0.5	3	97.1	4.6
	2	3	101	0.7
牛用プレミックス	0.1	3	98.9	4.8
	0.5	3	97.9	3.4
	2	3	97.2	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/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	0.25	96.5	3.9	5.1	0.73

（参考）クロマトグラム例



試料（プレミックス中）のクロマトグラム

3　塩化コリン

（適用範囲：プレミックス）

A　　試薬の調製

1)　塩化コリン標準液　　塩化コリン〔$C_5H_{14}ClNO$〕10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて塩化コリン標準原液を調製する（この液 1 mL は、塩化コリンとして 0.1 g を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中に塩化コリンとして 1

mg を含有する塩化コリン標準液を調製する。

2) ライネッケ塩試液　　ライネッケ塩一水和物 4.0 g（3.95~4.04 g）をメタノールに溶かして 100 mL とし、冷所に保存する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール－クロロホルム（10+1）100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出し、ろ紙（3 種）でろ過し、抽出液とする。

コリンライネッケ塩の生成及び溶出　　抽出液 5 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C 以下の水浴で減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

水を加えて残留物を溶かし、この液を 100 mL のトールビーカーに入れ、先のなす形フラスコを水で洗浄し、洗液を先のトールビーカーに合わせ、更に水を加えて 40 mL とする。この液を氷水中で 5 °C 以下に冷却し、ライネッケ塩試液 3 mL を加え、ときどきかき混ぜながら 30 分間静置してコリンライネッケ塩の結晶を生成させる。

生成した結晶をガラスろ過器（1G4）で吸引ろ過し、先のトールビーカーを水で洗浄し、同様に吸引ろ過する。ガラスろ過器内の結晶を水 5 mL ずつで 3 回、メタノール 1 mL ずつで 5 回洗浄し、更に洗液を吸引して結晶を乾燥させる。

ガラスろ過器内の結晶にアセトンを加えて溶かし、溶液を吸引して 50 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、測定に供する試料溶液とする。

同時に、塩化コリン標準液 5~20 mL の間の数点をそれぞれ 100 mL のトールビーカーに正確に入れ、水を加えて 40 mL とし、以下抽出液と同様に操作して各標準液を調製する。

測　　定　　試料溶液及び各標準液をそれぞれ共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 5 分間遠心分離する。上澄み液について、アセトンを対照液として波長 525 nm の吸光度を測定する。

計　　算　　得られた吸光度から検量線を作成し、試料中の塩化コリン量を算出する。

4　塩酸ジベンゾイルチアミン

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

1) 抽出溶媒　　塩酸 8.7 mL にエタノール 700 mL を加え、更に水を加えて 1 L とする。

2) 塩酸ジベンゾイルチアミン標準液　　塩酸ジベンゾイルチアミン〔$C_{26}H_{26}N_4O_4S$·HCl〕（減圧デシケーター（シリカゲル）中で 24 時間乾燥したもの）100 mg を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色全量フラスコに入れ、抽出溶媒を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて塩酸ジベンゾイルチアミン標準原液を調製する（この液 1 mL は、塩酸ジベンゾイルチアミンとして 0.5 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL 中に塩酸ジベンゾイルチアミンとして 1~10 μg を含有する数点の塩酸ジベンゾイルチアミン標準液を調製する。

3) L-システイン塩酸塩溶液　　L-システイン塩酸塩一水和物 1.0 g（0.95~1.04 g）を水に溶かして 50 mL とする（使用時に調製する。）。

4) 臭化シアン試液　　臭化シアン 1.0 g（0.95~1.04 g）を水に溶かして 25 mL とする（使用時に調製し、氷冷しながら使用する。）。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、抽出溶媒 50 mL を加え、70 °C の水浴中で 1 時間振り混ぜて抽出した後放冷する。

この褐色全量フラスコの標線まで抽出溶媒を加え、この液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 3 分間遠心分離し、上澄み液をシステイン分解に供する試料溶液とする。

システイン分解　　試料溶液 5 mL を 20 mL のビーカーに正確に入れ、L-塩酸システイン溶液 5 mL を加えてかき混ぜ、水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）で pH を 7.0~7.5 に調整する。この液を水で 25 mL の全量フラスコに移し、ときどき軽く振り混ぜながら 30 分間静置する。この液に塩酸（1 mol/L）0.5 mL を加え、更に褐色全量フラスコの標線まで水を加えてチオクローム化に供する試料溶液とする。

同時に、各塩酸ジベンゾイルチアミン標準液 5 mL について、試料溶液の場合と同様に操作し、チオクローム化に供する各塩酸ジベンゾイルチアミン標準液とする。

別に、試料溶液 5 mL を 25 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで水を加えてチオクローム化に供する空試験溶液とする。

チオクローム化　　試料溶液、各塩酸ジベンゾイルチアミン標準液及び空試験溶液各 5 mL をそれぞれ 25 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、臭化シアン試液 1 mL を加えて振り混ぜる。更にこの液に水酸化ナトリウム溶液（10 w/v%）1 mL を加えて振り混ぜた後 5 分間静置し、標線まで水を加える。この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　　チオクローム化した試料溶液、各塩酸ジベンゾイルチアミン標準液及び空試験溶液各 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：375 nm、蛍光波長：450 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 3.9 mm、長さ 300 mm、粒径 10 µm）[注1]

溶　離　液：メタノール－水（7+3）

流　　速：1.0 mL/min

計　　算　　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料溶液のクロマトグラムのピーク高さ又は面積から空試験溶液のピーク高さ又は面積を差し引いた後、試料中の塩酸ジベンゾイルチアミン量を算出する。

注 1　µBondapak C_{18}（Waters 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

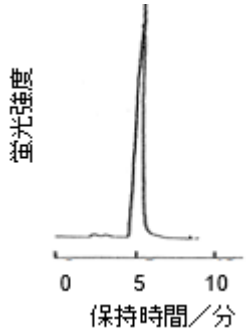
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度（g/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
プレミックス1	0.1	3	97.2	12
	0.5	3	95.6	6.0
	2	3	96.2	11
プレミックス2	0.1	3	91.9	13
	0.5	3	87.2	4.3
	2	3	88.4	6.1
プレミックス3	0.1	3	89.9	5.7
	0.5	3	87.4	7.9
	2	3	94.5	6.6

・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/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	0.5	103	3.0	4.8	0.77

（参考）クロマトグラム例



試料（プレミックス中）のクロマトグラム

5　塩酸チアミン

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

塩酸チアミン標準液　塩酸チアミン（標準品）0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、塩酸（0.1 mol/L）を加えて溶かし、更に標線まで同液を加えて塩酸チアミン標準原液を調製する（この液 1 mL は、塩酸チアミン〔$C_{12}H_{18}ON_4SCl_2$〕として 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中に塩酸チアミンとして 0.2~2 μg を含有する数点の塩酸チアミン標準液を調製する。

B　定　量

抽　出　分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、塩酸（0.1 mol/L）100 mL を加え、50 °C の水浴中で 30 分間振り混ぜて抽出した後放冷する。

抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 15 分間遠心分離し、上澄み液 10 mL を 100 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、更に標線まで水を加える。この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

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

測定条件　例

検　出　器：紫外吸光光度検出器（測定波長：245 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 3.9 mm、長さ 300 mm、粒径 10 μm）[注1] 又はこれと同等のもの

溶　離　液：1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム 0.94 g（0.935~0.944 g）を水－メタノール（13+7）に溶かして 1 L とし、酢酸で pH を 3.0~3.5 に調整する。

流　　速：0.8 mL/min

計　　算　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中の塩酸チアミン量を算出する。

注 1　μBondapak C_{18}（Waters 製）又はこれと同等のもの

6　塩酸ピリドキシン

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

塩酸ピリドキシン標準液　塩酸ピリドキシン（標準品）0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、塩酸（0.1 mol/L）を加えて溶かし、更に標線まで同液を加えて塩酸ピリドキシン標準原液を調製する（この液 1 mL は、塩酸ピリドキシン〔$C_8H_{12}ClNO_3$〕として 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中に塩酸ピリドキシンとして 0.2~2 μg を含有する数点の塩酸ピリドキシン標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、塩酸（0.1 mol/L）100 mL を加え、50 °C の水浴中で 30 分間振り混ぜて抽出した後放冷する。

抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 15 分間遠心分離し、上澄み液 10 mL を 100 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、更に標線まで水を加える。この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　試料溶液及び各塩酸ピリドキシン標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件　例

検　出　器：紫外吸光光度検出器（測定波長：290 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 3.9 mm、長さ 300 mm、粒径 10 μm）[注1]

溶　離　液：1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム 0.94 g（0.935~0.944 g）を水－メタノール（13+7）に溶かして 1 L とし、酢酸で pH を 3.0~3.5 に調整する。

流　　速：0.8 mL/min

計　　算　　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中の塩酸ピリドキシン量を算出する。

注 1　μBondapak C_{18}（Waters 製）又はこれと同等のもの

7　コレカルシフェロール又はビタミン D_3 油

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

1)　コレカルシフェロール標準液　　コレカルシフェロール〔$C_{27}H_{44}O$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、エタノールを加えて溶かし、更に標線までエタノールを加えてコレカルシフェロール標準原液を調製する（この液 1 mL は、コレカルシフェロールとして 4 万国際単位を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をエタノールで正確に希釈し、1 mL 中にコレカルシフェノールとして 5~50 国際単位を含有する数点のコレカルシフェロール標準液を調製する。

2)　中性アルミナ　　カラムクロマトグラフ用中性アルミナ（粒径 63~200 μm（230~70 メッシュ））[注1]を 130 °C で 2 時間乾燥する。

B　定　　量[注2]

抽　　出　　分析試料 2~10 g（コレカルシフェロールとして 500~5,000 国際単位相当量）を有効筋 4 桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、ジメチルスルホキシド 20 mL を加えて 15 分間かき混ぜる。これをエタノール 180 mL で 300 mL の褐色共栓三角フラスコに移し、更に 10 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、650×*g* で 3 分間遠心分離し、上澄み液をカラムクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

精　　製　　中性アルミナ 5 g（4.5~5.5 g）及び硫酸ナトリウム（無水）1 g（0.9~1.1 g）を褐色カラム管（内径 10 mm）に乾式で充てんし、カラムを調製する。

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

液体クロマトグラフィー　　試料溶液及び各コレカルシフェロール標準液各 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：265 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm）[注3]

溶　離　液：アセトニトリル－メタノール（3+1）

流　　速：1.4 mL/min

計　　算　　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のコレカルシフェロール量を算出する。

注 1　Aluminium oxide 90 active neutral Art.1077（Merck 製）又はこれと同等のもの
2　定量操作は遮光した状態で行う。
3　Nucleosil 5C_{18}（Macherey-Nagel 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

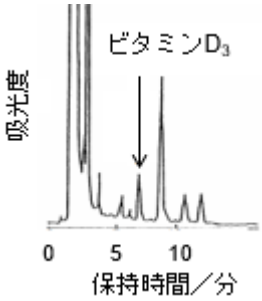
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度（万IU/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	103	4.8
	100	3	98.1	2.1
	500	3	99.7	1.2
豚用プレミックス	10	3	102	3.7
	100	3	103	1.3
	500	3	99.9	2.4
牛用プレミックス	10	3	97.8	0.0
	100	3	100	0.9
	500	3	99.3	2.4

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（万IU/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	5	0	109	101	3.2	7.4	0.76

（参考）クロマトグラム例



試料（プレミックス中）のクロマトグラム

8　酢酸 *dl*-*α*-トコフェロール

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

酢酸 *dl*-*α*-トコフェロール標準液　酢酸 *dl*-*α*-トコフェロール〔$C_{31}H_{52}O_3$〕1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、エタノールを加えて溶かし、更に標線までエタノールを加えて酢酸 *dl*-*α*-トコフェロール標準原液を調製する（この液 1 mL は、酢酸 *dl*-*α*-トコフェロールとして 10 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をエタノールで正確に希釈し、1 mL 中に酢酸 *dl*-*α*-トコフェノールとして 0.2~1 mg を含有する数点の酢酸 *dl*-*α*-トコフェロール標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出[注1]　分析試料 1~20 g（酢酸 *dl*-*α*-トコフェロールとして 10~50 mg 相当量）を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、

エタノール 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、650×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　試料溶液及び各酢酸 *dl*-*α*-トコフェロール標準液 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：紫外吸光光度検出器（測定波長：280 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 10 µm）注 2

溶　離　液：メタノール

流　　速：1.2 mL/min

計　　算　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中の酢酸 *dl*-*α*-トコフェロール量を算出する。

注 1　スプレードライ製剤を用いたプレミックスの場合は、ジメチルスルホキシド 20 mL を加え、10 分間かき混ぜた後、更にエタノール 80 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。

水分散性製剤を用いたプレミックスの場合は、エタノール 100 mL を加え、60 °C の水浴中でときどき振り混ぜながら 10 分間加温した後、更に 20 分間かき混ぜて抽出する。

2　Fine Pak SIL C18T-10（日本分光製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

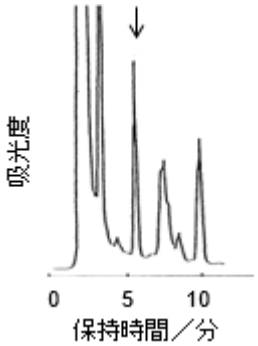
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
鶏用プレミックス	0.15	5	97.5	3.7
	1	5	97.8	0.7
	10	5	97.2	2.0
	50	5	95.4	1.1
豚用プレミックス	0.15	5	96.9	4.6
	1	5	99.5	1.8
	10	5	96.6	1.2
	50	5	96.3	2.4
牛用プレミックス	0.15	5	101	3.9
	1	5	101	2.1
	10	5	98.0	0.9
	50	5	96.4	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/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	5	0	7.334	91.2	1.6	2.7	0.64

（参考）クロマトグラム例



試料（プレミックス中）のクロマトグラム

9　シアノコバラミン

（適用範囲：プレミックス）

A　　試薬の調製

1)　シアノコバラミン標準液　　シアノコバラミン（標準品）0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてシアノコバラミン標準原液を調製する（この液 1 mL は、シアノコバラミン〔$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$〕として 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をジエチルエーテル飽和水で正確に希釈し、1 mL 中にシアノコバラミンとして 0.1~2 μg を含有する数点のシアノコバラミン標準液を調製する。

2)　抽出溶媒　　L-システイン塩酸塩一水和物 20.0 g（19.95~20.04 g）を水に溶かして 1 L とする（使用時に調製する。）。

B　　定　　量[注1]

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 80 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液を精製に供する試料溶液とする。

精　　製　　試料溶液 20 mL を 50 mL の褐色共栓遠心沈殿管に正確に入れ、フェノール溶液（80 v/v%）25 mL を正確に加えて振り混ぜた後、1,500×*g* で 5 分間遠心分離する。

フェノール層（下層[注2]）20 mL を 100 mL の分液漏斗 A に正確に入れ、ジエチルエーテル 40 mL 及び水 5 mL を加えて 2 分間振り混ぜた後、水層（下層）を 100 mL の分液漏斗 B に入れる。残留液に水 5 mL を加え、同様に 2 回操作し、水層を分液漏斗 B に合わせる。

水層をジエチルエーテル 50 mL で 2 回洗浄した後、20 mL の褐色全量フラスコに入れ、更に標線までジエチルエーテル飽和水を加える。この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　　試料溶液及び各シアノコバラミン標準液各 40 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：吸光光度計（測定波長：550 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 3.9 mm、長さ 300 mm、粒径 10 μm）[注3]

溶　離　液：0.05 mol/L 酢酸アンモニウム溶液－アセトニトリル（41+9）

流　　速：0.5 mL/min

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、次式により試料中のシアノコバラミン量を算出する。

$$\text{試料中のシアノコバラミン量（mg/kg）} = \frac{A \times 1.09}{4}$$

A ：検量線から求めたシアノコバラミンの質量（ng）

注 1　定量操作は遮光した状態で行う。

2　通常、このフェノール層は下層になるが、水溶性物質の含量の多い試料ではフェノール層が上層になる場合がある。

3　μBondapak C_{18}（Waters 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

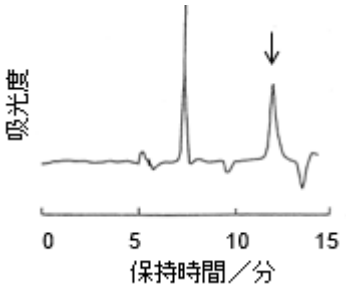
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
鶏用プレミックス	5	3	84.3	2.0
	20	3	96.1	7.7
豚用プレミックス	5	3	92.6	3.0
	20	3	92.0	10
牛用プレミックス	5	3	86.1	6.3
	20	3	93.0	11

・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（mg/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	4	0	5	92.6	5.0	9.7	0.76

（参考）クロマトグラム例



試料（子豚用プレミックス中）のクロマトグラム

10　硝酸チアミン

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

硝酸チアミン標準液　　硝酸チアミン〔$C_{12}H_{17}N_5O_4S$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、塩酸（0.1 mol/L）を加えて

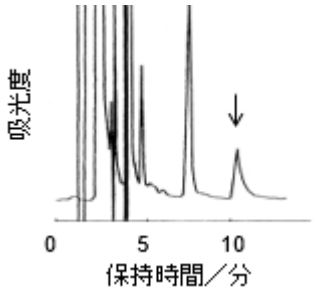
溶かし、更に標線まで同液を加えて硝酸チアミン標準原液を調製する（この液 1 mL は、硝酸チアミンとして 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中に硝酸チアミンとして 0.2~2 μg を含有する数点の硝酸チアミン標準液を調製する。

B　定　　量

5 の B による。ただし、塩酸チアミンとあるのは硝酸チアミンと読み替えるものとする。

（参考）クロマトグラム例



試料（プレミックス中）のクロマトグラム

11　ニコチン酸

（適用範囲：プレミックス（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クロルテトラサイクリンを含まないプレミックス及び DL-メチオニン又はパラアミノ安息香酸の含量がニコチン酸の含量に対しそれぞれ 8 倍又は 300 倍を超えないプレミックス）

A　試薬の調製

1)　緩衝液　　ホウ酸（1 w/v%）250 mL に塩化カリウム溶液（1.5 w/v%）250 mL を加え、更に水を加えて 850 mL とし、水酸化ナトリウム溶液（0.2 mol/L）で pH を 9.2 に調整する。

2)　ニコチン酸標準液　　ニコチン酸〔$C_6H_5NO_2$〕50 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、緩衝液を加えて溶かし、更に標線まで緩衝液を加えてニコチン酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、ニコチン酸として 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を緩衝液で正確に希釈し、1 mL 中にニコチン酸として 10~50 μg を含有する数点のニコチン酸標準液を調製する。

3)　発色試薬　　臭化シアン 1.0 g（0.95~1.04 g）を緩衝液に溶かして 100 mL とする。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、更に酸性白土 1.0 g（0.95~1.04 g）及び緩衝液 100 mL を加え、15 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5 種 B）でろ過し、測定に供する試料溶液とする。

測　　定　　試料溶液 2 mL ずつをそれぞれ 25 mL の褐色全量フラスコ A 及び B に正確に入れる。緩衝液 10 mL を全量フラスコ A に加えた後、発色試液 5 mL を正確に加

え、更に標線まで緩衝液を加えた後 30 分間静置する。

この液について、緩衝液を対照液として波長 406 nm の吸光度を測定する。

緩衝液を全量フラスコ B の標線まで加えて空試験溶液とし、同様に操作して吸光度を測定し、先の吸光度を補正する。

同時に、各ニコチン酸標準液各 2 mL をそれぞれ 25 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、緩衝液 10 mL ずつを加え、以下試料溶液の場合と同一条件で測定する。

計　　算　　得られた吸光度から検量線を作成し、試料中のニコチン酸量を算出する。

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
鶏用プレミックス	1	2	97.5	0.6
	10	2	99.3	0.4
	50	2	103	2.5
豚用プレミックス	1	2	90.2	2.0
	10	2	92.0	0.6
	50	2	100	2.1
牛用プレミックス	1	2	101	1.9
	10	2	97.7	0.9
	50	2	99.5	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/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	20	102	2.1	3.0	0.84

12　ニコチン酸アミド

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

1)　抽出溶媒　　水－メタノール－酢酸（2+2+1）

2)　ニコチン酸アミド標準液　　ニコチン酸アミド〔C_6H_6NO〕1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、抽出溶媒を加えて溶かし、更に標線まで抽出溶媒を加えてニコチン酸アミド標準原液を調製する（この液 1 mL は、ニコチン酸アミドとして 10 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にニコチン酸アミドとして 0.04~0.16 mg を含有する数点のニコチン酸アミド標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 2.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 3 分間遠心分離し、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　　試料溶液及び各ニコチン酸アミド標準液各 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：262 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 250mm、粒径 10 μm）[注1]

溶　離　液：1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム 0.94 g（0.935~0.944 g）を水－メタノール（4+1）に溶かして 1 L とし、酢酸で pH を 3.0~3.5 に調整する。

流　　速：1.0 mL/min

計　　算　　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のニコチン酸アミド量を算出する。

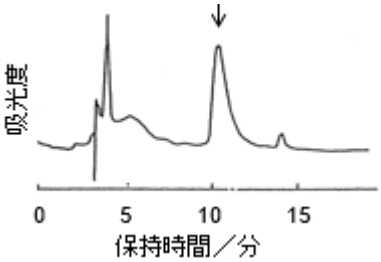
注 1　Fine Pak SIL C18T-10（日本分光製）液体クロマトグラフ用試薬又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r（%）
鶏用プレミックス	0.5	5	100	3.0
	5	5	103	0.7
	20	5	105	0.5
豚用プレミックス	0.5	5	96.1	1.0
	5	5	101	0.6
	20	5	101	0.5
牛用プレミックス	0.5	5	108	4.1
	5	5	103	0.6
	20	5	106	0.5

（参考）クロマトグラム例



試料（プレミックス中）のクロマトグラム

13　パラアミノ安息香酸

（適用範囲：プレミックス）

A　　試薬の調製

1)　抽出溶媒　　水－メタノール（3+1）

2)　パラアミノ安息香酸標準液　　パラアミノ安息香酸〔$C_7H_7O_2N$〕50 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、抽出溶媒を加えて溶かし、更に標線まで抽出溶媒を加えてパラアミノ安息香酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、パラアミノ安息香酸として 0.5 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にパラアミノ安息香酸として 10~50 μg を含有する数点のパラアミノ安息香酸標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 10 mL を加え 30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、650×*g* で 3 分間遠心分離し、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　　試料溶液及び各パラアミノ安息香酸標準液各 10 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件　例

検　出　器：紫外吸光光度検出器（測定波長：254 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 3.9 mm、長さ 300 mm、粒径 10 µm）[注1]

溶　離　液：テトラ-*n*-ブチルアンモニウムヒドロキシド溶液（10 w/v%）13.2 mL に水－メタノール（4+1）を加えて 1 L とし、リン酸で pH を 7.0~7.5 に調整する。

流　　速：1.0 mL/min

計　　算　　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のパラアミノ安息香酸量を算出する。

注 1　µBondapak C_{18}（Waters 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

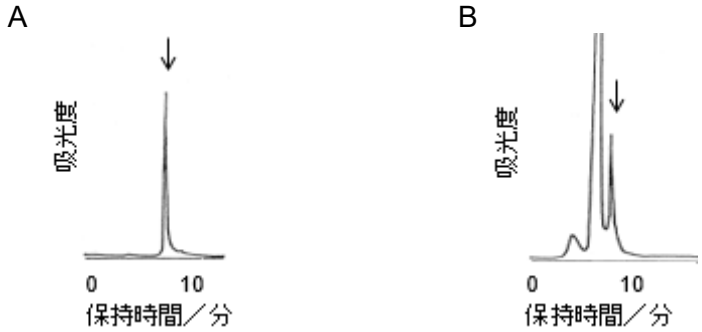
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
マス用プレミックス	2	5	95.9	2.5
	3	5	93.9	2.0
	5	5	95.3	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/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	1.5	95.3	5.2	7.1	1.3

（参考）クロマトグラム例



標準液及び試料のクロマトグラム

A：標準液（パラアミノ安息香酸として 200 ng 注入）

B：試料（こい用プレミックス）

14　D-パントテン酸カルシウム又はDL-パントテン酸カルシウム

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

パントテン酸カルシウム標準液　パントテン酸カルシウム〔$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてパントテン酸カルシウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、パントテン酸カルシウムとして 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中にパントテン酸カルシウムとして 5~20 µg を含有する数点のパントテン酸カルシウム標準液を調製する。

B　定　量

抽　出　分析試料 2.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、水 100 mL を加え、15 分間かき混ぜて抽出した後静置し、抽出液の上澄み液をろ紙（3 種）でろ過する。ろ液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中にパントテン酸カルシウムとして 5~20 µg を含有する溶液を調製し、活性白土処理に供する試料溶液とする。

活性白土処理　試料溶液 20 mL を 50 mL の褐色共栓遠心沈殿管に正確に入れ、活性白土 1.0 g（0.95~1.04 g）を加えて 1 分間振り混ぜた後、650×*g* で 5 分間遠心分離する。上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

同時に、各パントテン酸カルシウム標準液について、同様に活性白土処理を行う。

液体クロマトグラフィー　試料溶液及び各パントテン酸カルシウム標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件　例

検　出　器：紫外吸光光度検出器（測定波長：200 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 3.9 mm、長さ 300 mm、粒径 10 µm）[注1]

溶　離　液：リン酸緩衝液[注2]－メタノール（9+1）

流　　速：0.8 mL/min

計　算　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のパントテン酸カルシウム量を算出する。

注 1　µBondapak C_{18}（Waters 製）又はこれと同等のもの

2　リン酸二水素ナトリウム二水和物 1.56 g（1.555~1.564 g）を水に溶かして 1 L とし、塩酸（1+5）で pH を 3.0 に調整する。

（参考）分析法バリデーション

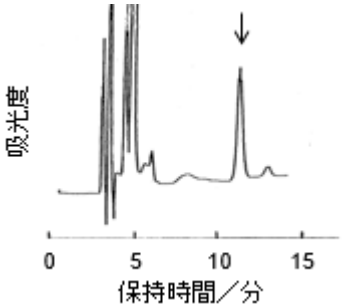
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r（%）
鶏用プレミックス	0.5	3	99.8	2.1
	4	3	98.3	2.9
	20	3	102	3.7
ブロイラー用プレミックス	0.5	3	103	2.8
	4	3	100	1.7
	20	3	98.2	1.4
豚用プレミックス	0.5	3	98.6	2.4
	4	3	98.6	2.1
	20	3	99.2	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/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	4	96.8	2.9	3.7	0.80

（参考）クロマトグラム例



試料（ブロイラー用プレミックス中）のクロマトグラム

15　*d*-ビオチン[注1]

（適用範囲：抗生物質を含まないプレミックス）

A　試薬の調製

1)　*d*-ビオチン標準液　　*d*-ビオチン〔$C_{10}H_{16}N_2O_3S$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、エタノール－水（1+1）を加えて溶かし、更に標線までエタノール－水（1+1）を加えて *d*-ビオチン標準原液を調製する（この液 1 mL は、*d*-ビオチンとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中に *d*-ビオチンとして 0.25 ng を含有する *d*-ビオチン標準液を調製する。

2)　培　　地

i)　保存用培地[注2]　　酵母エキス 5.5 g、ペプトン 12.5 g、D-グルコース 11.0 g、リン酸二水素カリウム 0.25 g、リン酸水素二カリウム 0.25 g、酢酸ナトリウム（無水）10.0 g、硫酸マグネシウム七水和物 0.1 g、硫酸マンガン（II）五水和物 5.0 mg、硫酸鉄（II）七水和物 5.0 mg 及びカンテン 20.0 g を水 1 L に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 6.7~6.9 に調整する。

これを小試験管（内径約 10 mm のもの）に 5 mL 分注し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後、高層に凝固させる。

ii) 接種用培地[注3]　i)の培地素材のうちカンテンを除いたものを水 1 L に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 6.7~6.9 に調整する。

これを小試験管（内径約 10 mm のもの）に 5 mL 分注し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

iii) 定量用基礎培地[注4]　カザミノ酸 12.0 g、L-シスチン 0.2 g、DL-トリプトファン 0.2 g、硫酸アデニン 20.0 mg、塩酸グアニン 20.0 mg、ウラシル 20.0 mg、塩酸チアミン 2.0 mg、リボフラビン 2.0 mg、パラアミノ安息香酸 0.2 mg、パントテン酸カルシウム 2.0 mg、ニコチン酸 2.0 mg、塩酸ピリドキシン 4.0 mg、リン酸二水素カリウム 1.0 g、リン酸水素二カリウム 1.0 g、硫酸マグネシウム七水和物 0.4 g、塩化ナトリウム 20.0 mg、硫酸鉄 20.0 mg、硫酸マンガン 20.0 mg、酢酸ナトリウム（無水）20.0 g 及び D-グルコース 40.0 g を水 1 L に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 6.7~6.9 に調整する。

3) 生理食塩液　塩化ナトリウム溶液（0.9 w/v%）を 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

4) 菌　液　試験菌として *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014 を用い、保存用培地に 35~37 °C で 16~24 時間、少なくとも 3 回継代培養する。この菌を接種用培地に移植し、35~37 °C で 16~24 時間培養した後、1,500×*g* で 10 分間遠心分離し、上澄み液を捨てる。残留物に生理食塩液 5 mL を加えて均等に浮遊させ、再び 1,500×*g* で 10 分間遠心分離し、上澄み液を捨てる。同様に 2 回操作した後、更に残留物に生理食塩液 5 mL を加えて浮遊させ、その一部を生理食塩液で 50 倍程度に希釈して菌液とする。

B　定　量

抽　出　分析試料 2.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 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 50 mL のビーカーに正確に入れ、水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）で pH を 6.7~6.9 に調整した後、水で 100 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加える。この液をろ紙（6 種）でろ過し、ろ液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中に *d*-ビオチンとして 0.1 ng（推定値）を含有する試料抽出液を調製する。

培　養　試料抽出液 0.5 mL、1 mL 及び 2 mL をそれぞれ試験管 2 本ずつに正確に入れ、更に各試験管に定量用基礎培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を 5 mL とする。各試験管を振り混ぜ、121 °C で 5 分間高圧蒸気滅菌した後冷却し、菌液 1 滴ずつを加え、35~37 °C で 16~24 時間培養して各試料溶液とする。

同時に、*d*-ビオチン標準液 0.1~1.2 mL の間の数点をそれぞれ試験管 2 本ずつに正確に入れ、以下試料抽出液と同様に操作して各標準液とする。

別に、水 2.5 mL 及び定量用基礎培地 2.5 mL を試験管に正確に入れ、以下試料抽出液と同様に操作して空試験溶液とする。

測　定　各試料溶液及び各標準液について、空試験溶液を対照液として波長 610 nm の吸光度を測定する。

計　算　得られた各標準液の吸光度から検量線を作成し、各試料溶液中の *d*-ビオチン濃度を求め、更に、試料抽出液の採取量から換算した試料抽出液中の *d*-ビオチン濃

度（平均値）を求め、試料中の *d*-ビオチン量を算出する。

注 1　器具類は必要に応じ、滅菌したものを用いる。

2　一般乳酸菌保存検出用培地「ニッスイ」（日水製薬製）又はこれと同等のもの。pH の調整を要する場合は、塩酸（1 mol/L）又は水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）を用いる。

3　一般乳酸菌接種用培地「ニッスイ」（日水製薬製）又はこれと同等のもの。pH の調整を要する場合は、塩酸（1 mol/L）又は水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）を用いる。

4　Biotin Assay Medium（Becton, Dickinson and Company 製）又はこれと同等のもの。pH の調整を要する場合は、塩酸（1 mol/L）又は水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）を用いる。

（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（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
鶏用プレミックス	1	6	103	5.2
	10	6	106	4.1
	100	6	102	2.1
豚用プレミックス	1	6	102	3.6
	10	6	99.5	4.2
	100	6	102	3.7
牛用プレミックス	1	6	107	5.6
	10	6	104	5.7
	100	6	103	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（mg/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	4	0	50	96.2	5.0	5.8	0.65

16　ビタミン A 粉末又はビタミン A 油

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

1)　酢酸レチノール標準液　　酢酸レチノール〔$C_{22}H_{32}O_2$〕100 万ビタミン A 単位相当量を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、2-プロパノールで 100 mL の褐色全量フラスコに移し、更に標線まで 2-プロパノールを加えて酢酸レチノール標準原液を調製する（空気を窒素で置換して保存する。）。

使用に際して、標準原液の一部を 2-プロパノールで正確に希釈し、1 mL 中に酢酸レチノールとして 5~20 ビタミン A 単位相当量を含有する数点の酢酸レチノール標準液を調製するとともに、補正係数を算出する[注1]。

2)　パルミチン酸レチノール標準液　　パルミチン酸レチノール〔$C_{36}H_{60}O_2$〕100 万ビタミン A 単位相当量を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、2-プロパノールで 100 mL の褐色全量フラスコに移し、更に標線まで 2-プロパノールを加えてパルミチン酸レチノール標準原液を調製する（空気を窒素ガスで置換して保存する。）。

使用に際して、標準原液の一部を 2-プロパノールで正確に希釈し、1 mL 中にパル

ミチン酸レチノールとして 5~20 ビタミン A 単位相当量を含有する数点のパルミチン酸レチノール標準液を調製するとともに、補正係数を算出する[注1]。

B　定　　量[注2]

抽　　出　　分析試料 1~2 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、ジメチルスルホキシド 20 mL を加えて 15 分間かき混ぜた後、エタノール 180 mL で 300 mL の褐色共栓三角フラスコに移す。更にこの液を 10 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　　試料溶液、各酢酸レチノール標準液及び各パルミチン酸レチノール標準液各 10 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件　例

検　出　器：紫外吸光光度検出器（測定波長：326 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4 mm、長さ 200 mm、粒径 5 µm）[注3]

溶　離　液：メタノール

流　　速：1.0 mL/min

計　　算　　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中の酢酸レチノール又はパルミチン酸レチノール量を算出し、酢酸レチノール及びパルミチン酸レチノールの合量をビタミン A 粉末又はビタミン A 油量とする。

注 1　補正係数の算出方法

1 mL 中に酢酸レチノール又はパルミチン酸レチノールとして 10 ビタミン A 単位相当量を含有する標準液について、層長 10 mm のセルを用い 2-プロパノールを対照液として 326 nm における吸光度を測定する。この吸光度から、次式により酢酸レチノール又はパルミチン酸レチノール標準液の補正係数を算出する。

$$f = A \times 1.9$$

f ：酢酸レチノール又はパルミチン酸レチノール標準液の補正係数

A ：酢酸レチノール又はパルミチン酸レチノール標準液の 326 nm における吸光度

2　定量操作は遮光した状態で行う。

3　Nucleosil $5C_{18}$（Macherey-Nagel 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

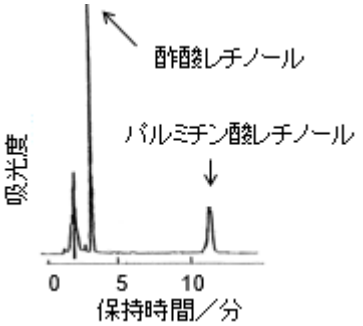
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度（万IU/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
鶏用プレミックス	50	3	101	4.2
	500	3	96.6	1.6
	2500	3	96.9	2.4
豚用プレミックス	50	3	100	4.6
	500	3	97.8	4.0
	2500	3	99.2	2.4
牛用プレミックス	50	3	96.1	2.8
	500	3	95.2	2.0
	2500	3	96.7	0.4

・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（万IU/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	500	99.0	3.7	3.7	0.71

（参考）クロマトグラム例



添加試料（鶏用プレミックスにビタミンＡとして 500 万 IU/kg 添加）のクロマトグラム

17　メナジオン亜硫酸水素ジメチルピリミジノール

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

1)　抽出溶媒　　亜硫酸水素ナトリウム 2.0 g（1.95~2.04 g）を水に溶かして 1 L とする。

2)　メナジオン亜硫酸水素ジメチルピリミジノール標準液　　メナジオン亜硫酸水素ジメチルピリミジノール〔$C_{17}H_{18}N_2O_6S$〕0.25 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、抽出溶媒を加えて溶かし、更に標線まで抽出溶媒を加えてメナジオン亜硫酸水素ジメチルピリミジノール標準原液を調製する（この液 1 mL は、メナジオン亜硫酸水素ジメチルピリミジノールとして 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL 中に亜硫酸水素ナトリウムとして 0.25~1.25 μg を含有する数点のメナジオン亜硫酸水素ジメチルピリミジノール標準液を調製する。

B　定　　量[注1]

抽　　出　　分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の褐色分液漏斗に入れ、クロロホルム 50 mL 及び抽出溶媒 100 mL を加え、15 分間振り混

ぜて抽出した後静置する。

水層（上層）をろ紙（5 種 A）でろ過し、ろ液 20 mL を 100 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、更に標線まで抽出溶媒を加え、活性白土処理に供する試料溶液とする。

活性白土処理　試料溶液 20 mL を 50 mL の褐色共栓遠心沈殿管に正確に入れ、活性白土 1.0 g（0.95~1.04 g）を加えて振り混ぜた後、650×*g* で 3 分間遠心分離する。上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　試料溶液及び各メナジオン亜硫酸水素ジメチルピリミジノール標準液各 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：230 nm）

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

溶　離　液：硫酸水素テトラブチルアンモニウム 0.24 g（0.235~0.244 g）及びリン酸水素二ナトリウム・12 水 1.80 g（1.795~1.804 g）を水－メタノール（7+3）に溶かして 1 L とし、リン酸で pH を 7.0 に調整する。

流　　速：0.8 mL/min

計　　算　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のメナジオン亜硫酸水素ジメチルピリミジノール量を算出する。

注 1　定量操作は遮光した状態で行う。

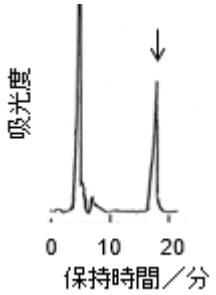
2　μBondapak C_{18}（Waters 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
プレミックス	4	0	0.5556	99.6	9.6	10	1.6

（参考）クロマトグラム例



試料（中すう用プレミックス中）のクロマトグラム

18　メナジオン亜硫酸水素ナトリウム

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

1)　抽出溶媒　亜硫酸水素ナトリウム 2.0 g（1.95~2.04 g）を水に溶かして 1 L とする。

2) メナジオン亜硫酸水素ナトリウム標準液　　メナジオン亜硫酸水素ナトリウム〔$C_{11}H_8O_2 \cdot NaHSO_3$〕250 mg を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、抽出溶媒を加えて溶かし、更に標線まで抽出溶媒を加えてメナジオン亜硫酸水素ナトリウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、メナジオン亜硫酸水素ナトリウムとしてを 1 mg 含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を抽出溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にメナジオン亜硫酸ナトリウムとして 0.25~1.25 μg を含有する数点のメナジオン亜硫酸水素ナトリウム標準液を調製する。

B　定　　量[注1]

抽　　出　　17 の B の抽出の項による。

活性白土処理　　17 の B の活性白土処理の項による。

液体クロマトグラフィー　　17 の B の液体クロマトグラフィーの項による。

計　　算　　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のメナジオン亜硫酸水素ナトリウム量を算出する。

なお、結晶水を有するメナジオン亜硫酸水素ナトリウム〔$C_{11}H_8O_2 \cdot NaHSO_3 \cdot 3H_2O$〕量に換算する場合は、先の値に 1.1957 を乗じて算出する。

注 1　定量操作は遮光した状態で行う。

（参考）分析法バリデーション

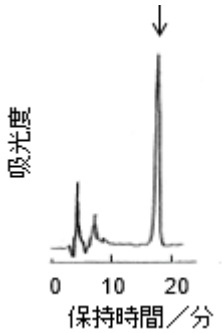
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
鶏用プレミックス	0.1	3	101	0.7
	0.5	3	100	0.1
	3	3	100	1.0
豚用プレミックス	0.1	3	107	0.1
	0.5	3	104	2.5
	3	3	100	2.3
牛用プレミックス	0.1	3	102	0.4
	0.5	3	100	0.9
	3	3	97.8	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/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	4	0	0.4014	109	6.6	9.1	1.4

（参考）クロマトグラム例



試料（ブロイラー用プレミックス中）のクロマトグラム

19　葉酸

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

葉酸標準液　葉酸〔$C_{19}H_{19}N_7O_6$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、水酸化ナトリウム溶液（0.1 mol/L）を加えて溶かし、更に、標線まで水酸化ナトリウム溶液（0.1 mol/L）を加えて葉酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、葉酸として 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を適量の水で希釈し、リン酸（0.17 mol/L）で pH を 7.0~7.5 に調整した後、水で正確に希釈し、1 mL 中に葉酸として 1~4 μg を含有する数点の葉酸標準液を調製する。

B　定　量[注1]

抽　出　分析試料 2.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、水酸化ナトリウム溶液（0.2 mol/L）100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 5 分間遠心分離する。

上澄み液 10 mL を 50 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、リン酸（0.17 mol/L）で pH を 7.0~7.5 に調整した後、標線まで水を加える。この液をろ紙（5 種 B）でろ過し、更に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　試料溶液及び各葉酸標準液各 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：280 nm）

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

溶　離　液：テトラ-*n*-ブチルアンモニウムヒドロキシド溶液（10 w/v%）13.2 mL を水－メタノール（4+1）に加えて 1 L とし、リン酸で pH を 7.0~7.5 に調整する。

流　　速：1.0 mL/min

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

注 1　定量操作は遮光した状態で行う。

2　μBondapak C_{18}（Waters 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
鶏用プレミックス	0.5	6	100	3.6
	1	6	99.9	4.8
	1.5	6	99.3	6.7
	2	6	101	6.0
豚用プレミックス	0.5	6	106	2.1
	1	6	103	2.1
	1.5	6	103	1.4
	2	6	102	0.2

・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/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	0.4	98.6	4.5	4.5	0.69

20　リボフラビン

20.1　ルミフラビン蛍光法

A　試薬の調製

1)　リボフラビン標準液　　リボフラビン〔$C_{17}H_{20}N_4O_6$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、酢酸（1+100）を加えて溶かし、更に標線まで同液を加えてリボフラビン標準原液を調製する（この液 1 mL は、リボフラビンとして 0.1 mg を含有する。）。

　使用に際して、標準原液の一部を酢酸（1+100）で正確に希釈し、1 mL 中にリボフラビンとして 0.1 µg を含有するリボフラビン標準液を調製する。

2)　緩衝液　　酢酸 6 mL 及び酢酸ナトリウム三水和物 13.6 g（13.55~13.64 g）を水に溶かして 1 L とし、酢酸で pH を 4.5 に調整する。

3)　ジアスターゼ溶液　　ジアスターゼ 5.0 g（4.95~5.04 g）に緩衝液 100 mL を加えて溶かし、酸性白土 0.2 g（0.195~0.204 g）を加えてかき混ぜた後、1,500×*g* で 15 分間遠心分離し、上澄み液を使用する（使用時に調製する。）。

B　定　　量[注1]

抽　　出　　分析試料 2.0 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、硫酸（0.05 mol/L）50 mL を加え、沸騰水浴中でときどき振り混ぜながら 30 分間加熱して抽出した後放冷する。抽出液の pH を酢酸ナトリウム三水和物溶液（4 mol/L）で 4.5 に調整し、更にジアスターゼ溶液 5 mL を加え、38 °C で 10 時間静置した後放冷する。この液を水で正確に希釈して 1 mL 中にリボフラビンとして 0.2 µg 以下を含有する溶液を調製し、この液の適量を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 15 分間遠心分離し、上澄み液を光分解に供する試料溶液とする。

光分解　　試料溶液 5 mL 及び酢酸（1+100）5 mL を褐色共栓遠心沈殿管 A に入れ、試料溶液 5 mL 及びリボフラビン標準液 5 mL を褐色共栓遠心沈殿管 B に入れる。更にそれぞれの遠心沈殿管にクロロホルム 5 mL を加え、振り混ぜた後、遠心分離する。

遠心沈殿管 A の水層（上層）2 mL ずつを褐色共栓遠心沈殿管 A'及び C'に正確に入れ、遠心沈殿管 B の水層 2 mL を褐色共栓遠心沈殿管 B'に正確に入れる。酢酸（1+1）0.4 mL を遠心沈殿管 C'に加えて振り混ぜ、更に水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）2 mL を加えて振り混ぜた後、暗所に 30 分間静置する。

遠心沈殿管 A'及び B'に水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）2 mL を加え、光分解装置に入れ、30 分間光分解した後、酢酸（1+1）0.4 mL ずつを遠心沈殿管 A'及び B'に加える。

測　　定　　クロロホルム 10 mL ずつを遠心沈殿管 A'、B'及び C'にそれぞれ正確に加え、2 分間振り混ぜた後遠心分離し、クロロホルム層（下層）について励起波長 450 nm 及び蛍光波長 510 nm で蛍光強度を測定する。

計　　算　　得られた各蛍光強度から、試料中のリボフラビン量を算出する。

注 1　定量操作は遮光した状態で行う。

（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（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
成鶏用配合飼料	2	6	96.7	13
	4	6	90.7	3.4
子豚用配合飼料	2	6	90.0	8.0
	4	6	87.6	5.7

・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（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
種鶏中すう用配合飼料	4	0	10	108	6.8	8.0	0.71

20.2　液体クロマトグラフ法

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

リボフラビン標準液　　リボフラビン〔$C_{17}H_{20}N_4O_6$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、サッカリンナトリウム溶液（10 w/v%）を加えて溶かし、更に標線までサッカリンナトリウム溶液（10 w/v%）を加えてリボフラビン標準原液を調製する（この液 1 mL は、リボフラビンとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中にリボフラビンとして 1~5 µg を含有する各リボフラビン標準液を調製する。

B　定　　量[注1]

抽　　出　分析試料 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、サッカリンナトリウム溶液（10 w/v%）100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。

抽出液を褐色遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 3 分間遠心分離し、上澄み液 10 mL を 100 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、更に標線まで水を加える。この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに

供する試料溶液とする。

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

測定条件　例

検　出　器：紫外吸光光度検出器（測定波長：266 nm）

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

溶　離　液：水－メタノール（73+27）

流　　速：0.8 mL/min

計　　算　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のリボフラビン量を算出する。

注 1　定量操作は遮光した状態で行う。

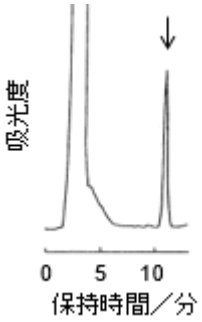
2　μBondapak C_{18}（Waters 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
鶏用プレミックス	0.2	5	99.9	1.5
	3	5	99.5	1.0
	10	5	99.7	0.6
豚用プレミックス	0.2	5	98.8	0.9
	3	5	100	0.8
	10	5	101	0.8
牛用プレミックス	0.2	5	101	0.5
	3	5	101	0.7
	10	5	100	0.3

（参考）クロマトグラム例



リボフラビンのクロマトグラム

21　リボフラビン酪酸エステル

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

リボフラビン酪酸エステル標準液　リボフラビン酪酸エステル（リボフラビンテトラブチレート）〔$C_{33}H_{44}N_4O_{10}$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、エタノールを加えて溶かし、更に標線までエタノールを加えてリボフラビン酪酸エステル標準原液を調製する（この液 1 mL は、リ

ボフラビン酪酸エステルとして 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をエタノールで正確に希釈し、1 mL 中にリボフラビンとして 5~30 μg を含有する数点のリボフラビン酪酸エステル標準液を調製する。

B　定　　量[注1]

抽　　出　　分析試料 1~2 g（リボフラビン酪酸エステルとして 1~10 mg 相当量）を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、エタノール 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 5 分間遠心分離する。上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　　試料溶液及び各リボフラビン酪酸エステル標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件　例

検　出　器：吸光光度計（測定波長：445 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4 mm、長さ 300 mm、粒径 10 μm）[注2]

溶　離　液：アセトニトリル－水（3+2）

流　　速：1.2 mL/min

計　　算　　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のリボフラビン酪酸エステル量を算出する。

注 1　定量操作は遮光した状態で行う。

2　Polygosil 60-10C_{18}（Macherey-Nagel 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
鶏用プレミックス	0.6	3	102	2.7
	6	3	101	2.1
	30	3	100	1.3
豚用プレミックス	0.6	3	102	1.2
	6	3	99.9	1.9
	30	3	100	3.3
牛用プレミックス	0.6	3	99.8	1.0
	6	3	98.6	0.4
	30	3	99.6	1.3

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
プレミックス	6	0	6	101	3.0	4.3	1.0

（参考）クロマトグラム例

試料（鶏用プレミックス中）のクロマトグラム

第 11 章　アミノ酸

第 1 節　各条

1　アスパラギン酸

1.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

2　アミノ酢酸

2.1　アミノ酸の液体クロマトグラフによる同時分析法

（適用範囲：ペプチド鉄を含まないプレミックス）

第 2 節 2 による。

2.2　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

3　アラニン

3.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

4　DL-アラニン

4.1　アミノ酸の液体クロマトグラフによる同時分析法

（適用範囲：ペプチド鉄を含まないプレミックス）

第 2 節 2 による。

5　アルギニン

5.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

6　イソロイシン

6.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

7　塩酸 L-リジン（塩酸 L-リシン）

7.1　液体クロマトグラフ法[注1]

（適用範囲：プレミックス）

A　試薬の調製

1)　緩衝液　ホウ酸 1.5 g（1.45~1.54 g）及び硝酸ナトリウム 21.0 g（20.95~21.04 g）を水に溶かして 1 L とし、水酸化ナトリウム溶液（6 mol/L）で pH を 9.5 に調整する。

2)　塩酸 L-リジン標準液　L-リジン一塩酸塩〔$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、緩衝液を加えて溶かし、更に標線まで緩衝液を加えて塩酸 L-リジン標準原液を調製する（この液 1 mL は、塩酸 L-リジンとして 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を緩衝液で正確に希釈し、1 mL 中に塩酸 L-リジンとして 2~8 µg を含有する数点の塩酸 L-リジン標準液を調製する。

3)　ホウ酸試液　ホウ酸 61.8 g（61.75~61.84 g）及び水酸化カリウム 52.5 g（52.45~52.54 g）を水に溶かして 2 L とし、水酸化カリウム溶液（6 mol/L）で pH を 10.4 に調整する。

4)　イオン交換樹脂　カラムクロマトグラフ用強酸性イオン交換樹脂（粒径 150~280 µm（100~50 メッシュ））[注2]

B　定　量

抽　出　分析試料 1~2 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、塩酸（0.1 mol/L）100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラムクロマトグラフィー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 20 mm）に 5 cm の高さまで流し込み、上端にガラスウールを詰め、更に水 50 mL を加え、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させてカラムを調製する。

試料溶液 10 mL をカラムに正確に入れ、流速 2 mL/min で充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させる。更に水をカラムに加えて同様に流出させ、流出液が硝酸銀溶液（0.1 mol/L）で白濁しなくなるまでカラムを洗浄する。

300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、アンモニア水（4 mol/L）150 mL をカラムに加えて塩酸 L-リジンを溶出させ、溶出液を 60 °C の水浴で減圧乾固する。緩衝液 20 mL を加えて残留物を溶かし、この液を 100 mL の全量フラスコに入れる。先のなす形フラスコを緩衝液 20 mL で 2 回洗浄し、洗液を先の全量フラスコに合わせ、更に標線まで緩衝液を加える。この液の一部を緩衝液で正確に希釈し、1 mL 中に塩酸 L-リジンとして 6 µg 以下を含有する溶液を調製する。この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　試料溶液及び各塩酸 L-リジン標準液各 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：338 nm、蛍光波長：425 nm）

カ　　ラ　　ム：スルホン化スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 9 µm）注 3

溶　　離　　液：緩衝液

蛍 光 反 応 液：*o*-フタルアルデヒド試液注 4－メルカプトエタノール試液注 5（1+1）

流　　速：溶離液　0.4 mL/min、蛍光反応液　0.4 mL/min

カラム槽温度：60 °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、試料中の塩酸 L-リジン量を算出する。

注 1　アミノ酸分析用試薬又はこれと同等のものを用いる。

2　Dowex 50W-X 8（H^+型、Dow Chemical 製）又はこれと同等のもの

3　アミノ酸分析用カラム（Waters 製）又はこれと同等のもの

4　*o*-フタルアルデヒド 1.4 g（1.35~1.44 g）をメタノール 10 mL に溶かし、ホウ酸試液 1 L 及びポリオキシエチレンドデシルエーテル溶液（15 w/v%）2 mL を加えて振り混ぜて調製する。

5　2-メルカプトエタノール 4 mL にメタノール 10 mL を加え、更にホウ酸試液 1 L 及びポリオキシエチレンドデシルエーテル溶液（15 w/v%）2 mL を加えて振り混ぜて調製する。

（参考）分析法バリデーション

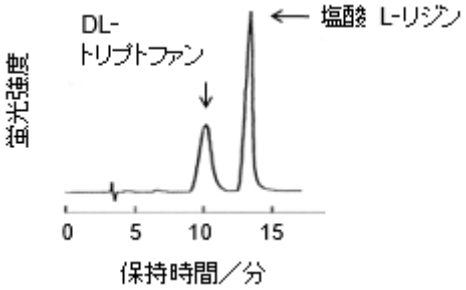
・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度（g/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	97.3	0.8
	40	3	95.7	1.1
	100	3	98.2	1.1
豚用プレミックス	10	3	96.7	2.9
	40	3	97.3	1.2
	100	3	98.4	6.9
牛用プレミックス	10	3	93.0	7.9
	40	3	96.9	2.8
	100	3	94.0	3.6

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（g/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
採卵鶏用プレミックス	5	0	40	95.8	3.3	5.1	1.6

（参考）クロマトグラム例



標準液（塩酸 L-リジンとして 4 μg/mL）のクロマトグラム

8　グルタミン酸

8.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

9　L-グルタミン酸ナトリウム

9.1　アミノ酸の液体クロマトグラフによる同時分析法

（適用範囲：ペプチド鉄を含まないプレミックス）

第 2 節 2 による。

10　シスチン

10.1　アミノ酸分析計法[注1]

（適用範囲：飼料）

A　　試薬の調製

1)　シスチン標準液　　L-シスチン〔$C_6H_{12}N_2O_4S_2$〕30 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）20 mL を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてシスチン標準液を調製する（この液 1 mL はシスチンとして 0.3 mg を含有する。）。

2)　過酸化水素水・ギ酸溶液　　過酸化水素水 50 mL にギ酸 450 mL を加えた後、1 時間静置する。

3)　緩衝液　　クエン酸三ナトリウム二水和物 19.6 g（19.55~19.64 g）、塩酸 16.5 mL、*n*-オクタン酸 0.10 g（0.095~0.104 g）、*β*-チオジグリコール 20 mL 及びポリオキシエチレンドデシルエーテル[注2]溶液（15 w/v%）2 mL を水に溶かして 1 L とする。

B　　定　　量

加水分解　　分析試料の一部（粗たん白質として 10 mg 相当量）を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、50 mL のなす形フラスコに入れ、過酸化水素水・ギ酸溶液 10 mL を加えてこの容器を密栓し、冷所（0~4 °C）に一夜静置する。これに消泡剤としてシリコン油 1~2 滴を加え、ほとんど乾固するまで減圧濃縮した後放冷する。

先のなす形フラスコに塩酸（6 mol/L）25 mL を加え、冷却管を付けた栓をし、

135 °C のシリコン油浴中で 20 時間加熱して分解した後放冷する。

分解液を 50 °C 以下の水浴で減圧濃縮し、水 10 mL を加え、同様に減圧濃縮して塩酸を揮散させる。この液を緩衝液で 25 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで緩衝液を加え、ろ紙（5 種 A）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

同時に、シスチン標準液 1~4 mL の間の数点をそれぞれ 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、同様に操作し、液体クロマトグラフィーに供する各シスチン標準液とする。

液体クロマトグラフィー　試料溶液及び各シスチン標準液の各一部をアミノ酸分析装置に注入し、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：570 nm）
カラム管：ガラス製（内径 8 mm、長さ 500 mm）
カラム充てん剤：強酸性陽イオン交換樹脂[注3]
溶離液：pH 3.27 緩衝液
反応液：ニンヒドリン試液
流速：1.15 mL/min
カラム槽温度：45 °C

計算　得られたクロマトグラムからシステイン酸のピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のシスチン量を算出する。

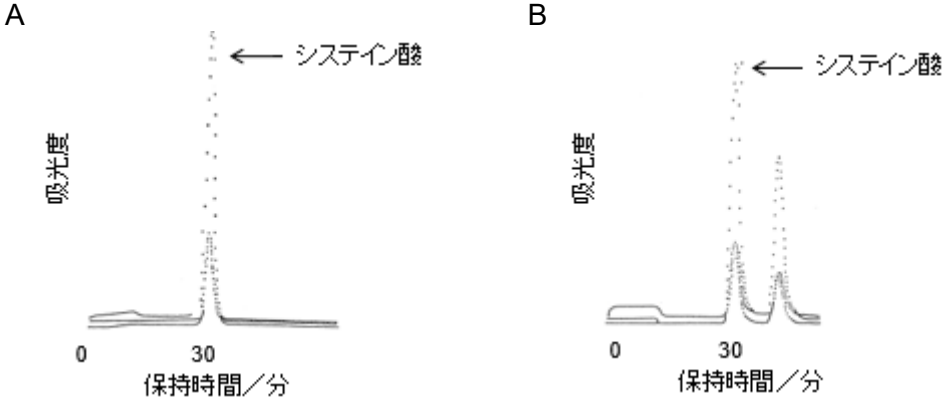
注 1　アミノ酸分析用試薬又はこれと同等のものを用いる。
2　Brij-35（Merck 製）又はこれと同等のもの
3　JEOL RESIN LCR-2（日本電子製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・繰返し精度

試料の種類	繰返し	平均測定値（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
成鶏用配合飼料	6	0.34	7.9
魚粉	6	0.78	3.6

（参考）クロマトグラム例



標準液（A）及び試料（B：魚粉）のクロマトグラム

11　セリン

11.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

12　チロシン

12.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

13　トリプトファン

13.1　吸光光度法

（適用範囲：飼料）

A　　試薬の調製

1)　トリプトファン標準液　　L-トリプトファン〔$C_{11}H_{12}N_2O_2$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてトリプトファン標準原液を調製する（この液 1 mL は、トリプトファンとして 1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中にトリプトファンとして 10~80 µg を含有する数点のトリプトファン標準液を調製する。

2)　*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド－硫酸溶液　　*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド 0.30 g（0.295~0.304 g）を硫酸（3+2）に溶かして 90 mL とする（使用時に調製する。）。

B　　定　　量[注1]

加水分解　　分析試料の一部（粗たん白質として 10 mg 相当量）を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、加水分解管に入れ、水酸化ナトリウム溶液（20 w/v%）5 mL を加える。この容器を密栓して加水分解炉に入れ、110 °C で 16 時間加熱して分解した後放冷する。

分解液を水で 25 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加え、ろ紙（5種 A）でろ過し、測定に供する試料溶液とする。

測　　定　　試料溶液 1 mL をあらかじめ *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド－硫酸溶液 9 mL を正確に入れた褐色共栓試験管に正確に入れ、振り混ぜた後 2 時間静置する。

この液に亜硝酸ナトリウム溶液（0.04 w/v%）0.1 mL を加えて振り混ぜた後 30 分間静置する。この液について、試料溶液 1.0 mL に水 9.1 mL を加えた液を対照液として 640 nm の吸光度を測定する。

同時に各トリプトファン標準液各一部について、試料溶液の場合と同一条件で測定する。

計　　算　　得られた吸光度から検量線を作成し、試料中のトリプトファン量を算出する。

注 1　定量操作は遮光した状態で行う。

（参考）分析法バリデーション

・繰返し精度

試料の種類	繰返し	平均測定値（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
成鶏用配合飼料	6	0.15	8.0
魚粉	6	0.59	1.7

14　トレオニン

14.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

15　L-トレオニン

15.1　アミノ酸の液体クロマトグラフによる同時分析法

（適用範囲：ペプチド鉄を含まないプレミックス）

第 2 節 2 による。

16　バリン

16.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

17　ヒスチジン

17.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

18　フェニルアラニン

18.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

19　プロリン

19.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

20　メチオニン

20.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

21　DL-メチオニン

21.1　アミノ酸の液体クロマトグラフによる同時分析法

（適用範囲：ペプチド鉄を含まないプレミックス）

第 2 節 2 による。

22　リジン（リシン）

22.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

23　ロイシン

23.1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 2 節 1 による。

第 2 節　多成分分析法

1　アミノ酸のアミノ酸分析計による同時分析法

(1)　分析対象化合物　　アスパラギン酸、アミノ酢酸、アラニン、アルギニン、イソロイシン、グルタミン酸、セリン、チロシン、トレオニン、バリン、ヒスチジン、フェニルアラニン、プロリン、メチオニン、リジン及びロイシン（16 成分）

(2)　適用範囲　　飼料

(3)　分析法[注1]

A　　試薬の調製

1)　緩衝液　　クエン酸三ナトリウム二水和物 19.6 g（19.55~19.64 g）、塩酸 16.5 mL、*n*-オクタン酸 0.10 g（0.095~0.104 g）、*β*-チオジグリコール 20 mL 及びポリオキシエチレンドデシルエーテル[注2]溶液（15 w/v%）2 mL を水に溶かして 1 L とする。

2)　アミノ酸混合標準液　　アミノ酸混合標準原液[注3] 5 mL を 25 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで緩衝液を加えてアミノ酸混合標準液を調製する（この液 1 mL は、アスパラギン酸〔$C_4H_7NO_4$〕、アミノ酢酸〔$C_2H_5NO_2$〕、アラニン〔$C_3H_7NO_2$〕、アルギニン〔$C_6H_{14}N_4O_2$〕、イソロイシン〔$C_6H_{13}NO_2$〕、グルタミン酸〔$C_5H_9NO_4$〕、セリン〔$C_3H_7NO_3$〕、チロシン〔$C_9H_{11}NO_3$〕、トレオニン〔$C_4H_9NO_3$〕、バリン〔$C_5H_{11}NO_2$〕、ヒスチジン〔$C_6H_9N_3O_2$〕、フェニルアラニン〔$C_9H_{11}NO_2$〕、プロリン〔$C_5H_9NO_2$〕、メチオニン〔$C_5H_{11}NO_2S$〕、リジン〔$C_6H_{14}N_2O_2$〕及びロイシン〔$C_6H_{13}NO_2$〕としてそれぞれ 0.5 μmol を含有する。）。

B　　定　　量

加水分解　　分析試料の一部（粗たん白質として 10 mg 相当量）を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、加水分解管に入れ、塩酸（6 mol/L）5 mL を加え、冷却しながら十分に脱気し、窒素ガスを充てんする。この容器を密栓して加水分解炉に入れ、110 °C で 20 時間加熱して分解した後放冷する。

分解液を水で 50 mL のなす形フラスコに移し、50 °C 以下の水浴で減圧濃縮し、水 10 mL を加え、同様に減圧濃縮して塩酸を揮散させる。この液を緩衝液で 25 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで緩衝液を加え、ろ紙（5 種 A）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　　試料溶液及びアミノ酸混合標準液各一部をアミノ酸分析装置に注入し、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：440 nm 及び 570 nm）

カ　ラ　ム　管：カラム管 A　ガラス製（内径 8 mm、長さ 500 mm）、
カラム管 B　ガラス製（内径 8 mm、長さ 150 mm）

カラム充てん剤：強酸性陽イオン交換樹脂[注4]

溶　　離　　液：カラム A　pH 3.27 緩衝液及び pH 4.25 緩衝液、
カラム B　pH 5.28 緩衝液

反　　応　　液：ニンヒドリン試液

流　　速：1.15 mL/min

カラム槽温度：45 °C

計　算　得られたクロマトグラムからピーク面積を求め、次式により試料中の各アミノ酸量を算出する[注5]。

$$試料中のアミノ酸量（\%）＝A\times\frac{B}{C}\times\frac{D}{W}\times25\times\frac{1}{10}$$

A：定量するアミノ酸標準液の濃度（μmol/mL）

B：試料溶液の定量するアミノ酸のピーク面積

C：標準液の定量するアミノ酸のピーク面積

D：定量するアミノ酸の分子量

W：分析に用いた試料の質量（mg）

注 1　アミノ酸分析用試薬又はこれと同等のものを用いる。

2　Brij-35（Merck 製）又はこれと同等のもの

3　アミノ酸混合標準液、H 型（アミノ酸自動分析用、富士フイルム和光純薬製）又はこれと同等のもの

4　JEOL RESIN LCR-2（日本電子製）又はこれと同等のもの

5　アスパラギン及びグルタミンはそれぞれアスパラギン酸及びグルタミン酸として定量される。

（参考）分析法バリデーション

・繰返し精度

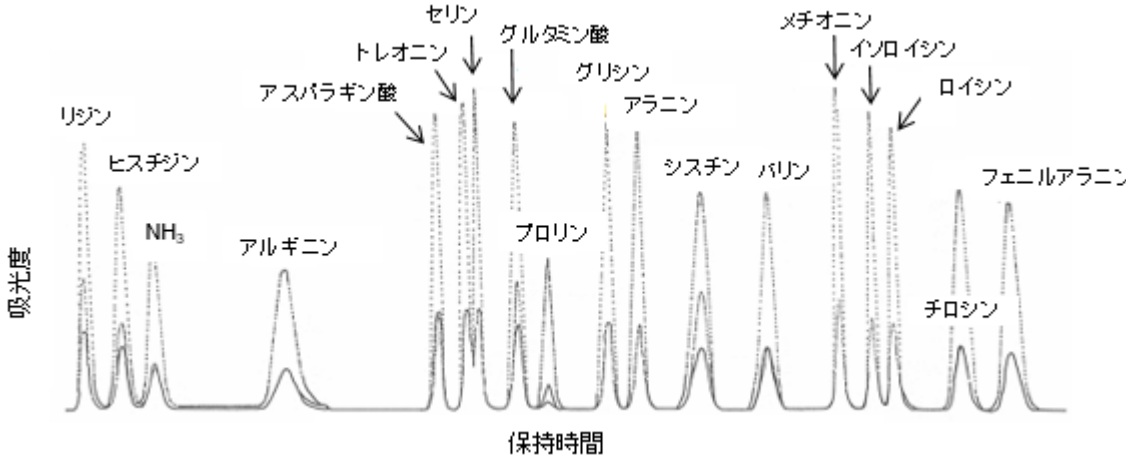
成分名	試料の種類	繰返し	平均測定値（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
アスパラギン酸	成鶏用配合飼料	3	1.38	2.5
	子豚用配合飼料	3	1.44	1.3
	乳用牛用配合飼料	3	1.56	2.6
アミノ酢酸	成鶏用配合飼料	3	1.02	5.8
	子豚用配合飼料	3	0.83	2.2
	乳用牛用配合飼料	3	0.85	0.0
アラニン	成鶏用配合飼料	3	1.06	3.3
	子豚用配合飼料	3	0.99	0.6
	乳用牛用配合飼料	3	0.95	1.3
アルギニン	成鶏用配合飼料	3	0.87	8.2
	子豚用配合飼料	3	0.89	6.0
	乳用牛用配合飼料	3	1.15	1.6
イソロイシン	成鶏用配合飼料	3	0.58	9.1
	子豚用配合飼料	3	0.59	5.9
	乳用牛用配合飼料	3	0.65	5.4
グルタミン酸	成鶏用配合飼料	3	2.47	8.6
	子豚用配合飼料	3	2.52	5.4
	乳用牛用配合飼料	3	2.89	6.3
セリン	成鶏用配合飼料	3	0.82	5.7
	子豚用配合飼料	3	0.84	7.0
	乳用牛用配合飼料	3	0.91	8.5
チロシン	成鶏用配合飼料	3	0.47	7.4
	子豚用配合飼料	3	0.45	12
	乳用牛用配合飼料	3	0.50	1.2
トレオニン	成鶏用配合飼料	3	0.61	3.0
	子豚用配合飼料	3	0.61	7.7
	乳用牛用配合飼料	3	0.70	6.7
バリン	成鶏用配合飼料	3	0.68	6.0
	子豚用配合飼料	3	0.67	5.2
	乳用牛用配合飼料	3	0.79	3.7
ヒスチジン	成鶏用配合飼料	3	0.41	2.9
	子豚用配合飼料	3	0.43	4.2
	乳用牛用配合飼料	3	0.45	13
フェニルアラニン	成鶏用配合飼料	3	0.70	7.6
	子豚用配合飼料	3	0.75	5.5
	乳用牛用配合飼料	3	0.81	6.5
プロリン	成鶏用配合飼料	3	1.19	2.9
	子豚用配合飼料	3	1.13	2.6
	乳用牛用配合飼料	3	1.05	3.9

・繰返し精度〔続き〕

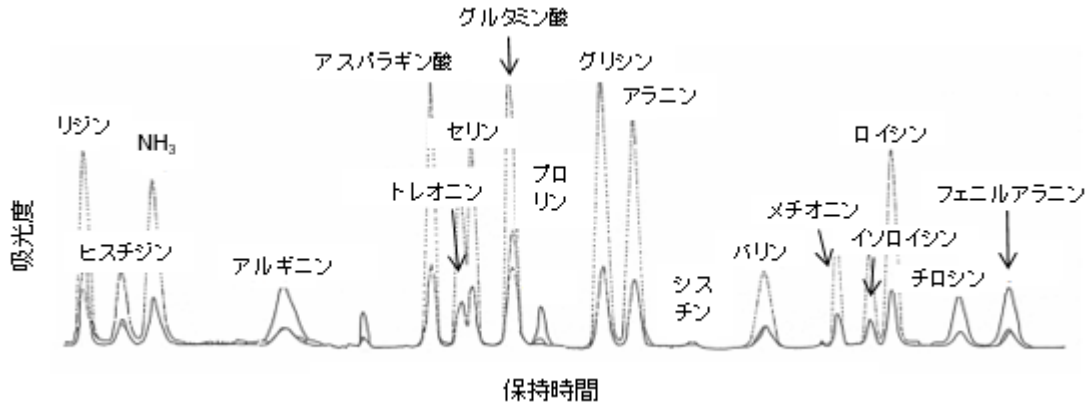
成分名	試料の種類	繰返し	平均測定値（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
メチオニン	成鶏用配合飼料	3	0.35	10
	子豚用配合飼料	3	0.28	8.6
	乳用牛用配合飼料	3	0.27	8.9
リジン	成鶏用配合飼料	3	0.84	3.5
	子豚用配合飼料	3	0.87	0.7
	乳用牛用配合飼料	3	0.88	8.7
ロイシン	成鶏用配合飼料	3	1.37	4.7
	子豚用配合飼料	3	1.40	1.7
	乳用牛用配合飼料	3	1.34	4.0

（参考）クロマトグラム例

A



B



標準液（Ａ）及び試料（Ｂ：魚粉）のクロマトグラム

2　アミノ酸の液体クロマトグラフによる同時分析法

(1)　分析対象化合物　　アミノ酢酸、DL-アラニン、L-グルタミン酸ナトリウム、L-トレオニン及び DL-メチオニン（5 成分）

(2)　適用範囲　　ペプチド鉄を含まないプレミックス

(3)　分析法[注1]

Ａ　　試薬の調製

1)　緩衝液　　クエン酸三ナトリウム二水和物 19.6 g（19.55~19.64 g）及びフェノール 1.0 g（0.95~1.04 g）を水に溶かして 1 L とし、硝酸で pH を 4.6 に調整する。

2)　アミノ酢酸標準原液　　アミノ酢酸〔$C_2H_5NO_2$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、緩衝液を加えて溶かし、更に標線まで緩衝液を加えてアミノ酢酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、アミノ酢酸として 1 mg を含有する。）。

3)　DL-アラニン標準原液　　DL-アラニン〔$C_3H_7NO_2$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、緩衝液を加えて溶かし、更に標線まで緩衝液を加えて DL-アラニン標準原液を調製する（この液 1 mL は、DL-アラニンとして 1 mg を含有する。）。

4)　L-グルタミン酸ナトリウム標準原液　　L-グルタミン酸ナトリウム

〔$C_5H_8NNaO_4 \cdot H_2O$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、緩衝液を加えて溶かし、更に標線まで緩衝液を加えて L-グルタミン酸ナトリウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、L-グルタミン酸ナトリウムとして 1 mg を含有する。）。

5) L-トレオニン標準原液　L-トレオニン〔$C_4H_9NO_3$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、緩衝液を加えて溶かし、更に標線まで緩衝液を加えて L-トレオニン標準原液を調製する（この液 1 mL は、L-トレオニンとして 1 mg を含有する。）。

6) DL-メチオニン標準原液　DL-メチオニン〔$C_3H_7NO_2$〕0.10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、緩衝液を加えて溶かし、更に標線まで緩衝液を加えて DL-メチオニン標準原液を調製する（この液 1 mL は、DL-メチオニンとして 1 mg を含有する。）。

7) アミノ酸混合標準液　各アミノ酸標準原液の一部を混合し、緩衝液で正確に希釈し、1 mL 中に各アミノ酸としてそれぞれ 2~8 µg を含有する数点のアミノ酸混合標準液を調製する。

8) ホウ酸試液　ホウ酸 61.8 g（61.75~61.84 g）及び水酸化カリウム 52.5 g（52.45~52.54 g）を水に溶かして 2 L とし、水酸化カリウム溶液（6 mol/L）で pH を 10.4 に調整する。

9) イオン交換樹脂　カラムクロマトグラフ用強酸性イオン交換樹脂（粒径 150~280 µm（100~50 メッシュ））[注2]

B　定　量

抽　出　分析試料 1~2 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラムクロマトグラフィー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 20 mm）に 5 cm の高さまで流し込み、上端にガラスウールを詰め、更に水 100 mL を加え、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させる。次に、アンモニア水（2 mol/L）100 mL を先のカラム管に加え、流速 5 mL/min で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樹脂を NH_4^+型にする。更に再び水 150 mL を先のカラム管に加え、同様に流出させてカラムを調製する。

300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液 10 mL をカラムに正確に入れ、流速 5 mL/min で充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流下してアミノ酢酸を流出させる。更に水 150 mL をカラムに加えて同様に流出させ、流出液を 60 °C の水浴で減圧乾固する。

緩衝液 20 mL を加えて残留物を溶かし、この液を 100 mL の全量フラスコに入れる。先のなす形フラスコを緩衝液 20 mL ずつで 2 回洗浄して洗液を先の全量フラスコに合わせ、更に標線まで緩衝液を加える。この液の一部を緩衝液で正確に希釈し、1 mL 中にアミノ酢酸として 6 µg 以下を含有する溶液を調製する。この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフ

ィーに供する試料溶液とする。

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

測定条件　例

検　出　器：蛍光検出器（励起波長：338 nm、蛍光波長：425 nm）

カ　ラ　ム：スルホン化スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 9 μm）[注3]

溶　離　液：緩衝液

蛍光反応液：*o*-フタルアルデヒド試液[注4]－メルカプトエタノール試液[注5]（1+1）

流　　速：溶離液　0.4 mL/min、蛍光反応液　0.4 mL/min

カラム槽温度：60 °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、試料中の各アミノ酸量を算出する。

注 1　アミノ酸分析用試薬又はこれと同等のものを用いる。

2　Dowex 50W-X 8（H^+型、Dow Chemical 製）又はこれと同等のもの

3　アミノ酸分析用カラム（Waters 製）又はこれと同等のもの

4　*o*-フタルアルデヒド 1.4 g（1.35~1.44 g）をメタノール 10 mL に溶かし、ホウ酸試液 1 L 及びポリオキシエチレンドデシルエーテル溶液（15 w/v%）2 mL を加えて振り混ぜて調製する。

5　2-メルカプトエタノール 4 mL にメタノール 10 mL を加え、更にホウ酸試液 1 L 及びポリオキシエチレンドデシルエーテル溶液（15 w/v%）（15 w/v%）2 mL を加えて振り混ぜて調製する。

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

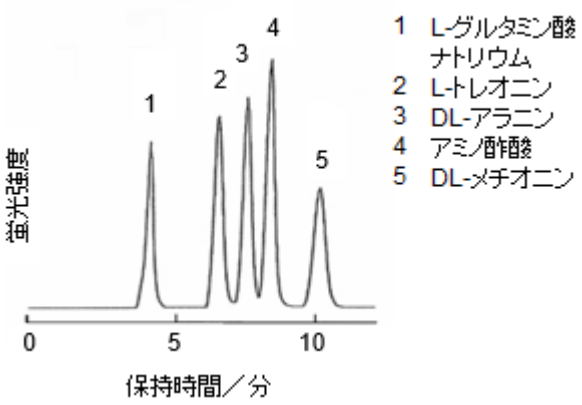
成分名	試料の種類	添加濃度 (g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
アミノ酢酸	鶏用プレミックス	10	3	99.3	8.5
		40	3	102	1.0
		100	3	101	5.4
	豚用プレミックス	10	3	96.0	3.4
		40	3	104	4.1
		100	3	102	6.2
	魚用プレミックス	10	3	98.6	4.9
		40	3	106	6.0
		100	3	99.4	0.6
DL-アラニン	鶏用プレミックス	10	3	110	4.5
		40	3	101	2.3
		100	3	103	2.3
	豚用プレミックス	10	3	108	1.6
		40	3	106	1.9
		100	3	102	3.0
	魚用プレミックス	10	3	104	6.0
		40	3	102	3.0
		100	3	105	3.9
L-グルタミン酸ナトリウム	採卵鶏用プレミックス	10	3	95.8	1.3
		40	3	103	3.1
		100	3	109	6.1
	ブロイラー用プレミックス	10	3	110	5.6
		40	3	102	0.3
		100	3	107	7.4
	豚用プレミックス	10	3	106	4.4
		40	3	101	4.6
		100	3	103	2.2
L-トレオニン	鶏用プレミックス	10	3	101	12
		40	3	99.5	4.6
		100	3	99.7	2.3
	豚用プレミックス	10	3	101	3.0
		40	3	103	3.2
		100	3	99.6	1.7
	魚用プレミックス	10	3	101	4.6
		40	3	102	3.7
		100	3	98.0	1.5
DL-メチオニン	採卵鶏用プレミックス	10	3	97.3	6.9
		40	3	99.1	0.8
		100	3	101	3.9
	ブロイラー用プレミックス	10	3	94.8	6.1
		40	3	93.5	2.3
		100	3	96.6	2.3
	豚用プレミックス	10	3	94.0	4.9
		40	3	97.8	1.7
		100	3	96.3	9.6

・共同試験

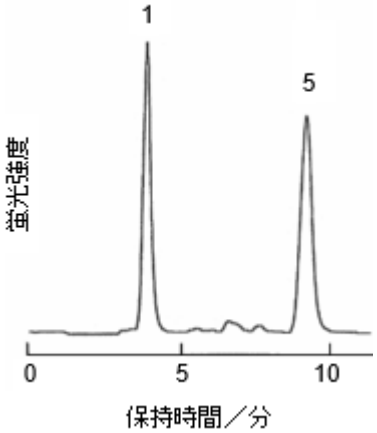
成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (g/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
アミノ酢酸	プレミックス	6	0	40	101	2.9	3.3	1.0
DL-アラニン	プレミックス	6	0	40	98.2	4.6	5.7	1.7
L-グルタミン酸ナトリウム	プレミックス	6	0	40	107	4.0	6.0	1.9
L-トレオニン	プレミックス	6	0	40	100	2.8	3.6	1.1
DL-メチオニン	プレミックス	6	0	40	97.7	3.7	4.4	1.3

（参考）クロマトグラム例

A



B



標準液（A：各アミノ酸として 4 μg/mL）及び試料（B）のクロマトグラム
（矢印は 1：L-グルタミン酸ナトリウム、2： L-トレオニン、3： DL-アラニン、
4：アミノ酢酸、5：DL-メチオニンを示す。）

第 12 章　防かび剤

第 1 節　各条

1　プロピオン酸、プロピオン酸カルシウム又はプロピオン酸ナトリウム

1.1　有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

第 2 節 1 による。

1.2　無機イオン及び有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

（適用範囲：サイレージ）

第 4 章第 2 節 1 による。

1.3　液体クロマトグラフ法

（適用範囲：飼料）

A　試薬の調製

プロピオン酸標準液　プロピオン酸カルシウム〔$C_6H_{10}CaO_4$〕1.257 g 又はプロピオン酸ナトリウム〔$C_3H_5NaO_2$〕1.297 g を量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてプロピオン酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、プロピオン酸としてプロピオン酸カルシウム採取量（g）に 7.956 を乗じた量又はプロピオン酸ナトリウム採取量（g）に 7.712 を乗じた量（mg）を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中にプロピオン酸として 25~500 µg を含有する数点のプロピオン酸標準液を調製する。

B　定　量

蒸　留　分析試料 50 g 以下の一部（プロピオン酸として 10~100 mg）を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、500 mL のケルダールフラスコに入れ、水 200 mL、塩化ナトリウム 80.0 g（79.95~80.04 g）、リン酸（1+9）10 mL 及び消泡剤としてシリコン油 1~2 滴を加える。このケルダールフラスコをあらかじめ水 30 mL を入れた受器を接続した水蒸気蒸留装置に連結し、留出液量が約 450 mL に達するまで蒸留する。

留出液を水で 500 mL の全量フラスコに移し、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　試料溶液及び各プロピオン酸標準液各 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：210 nm）

カ　ラ　ム：強酸性陽イオン交換体カラム（内径 8 mm、長さ 300 mm、平均粒径 10 µm）[注 1]

ガードカラム：強酸性陽イオン交換体カラム（内径 8 mm、長さ 50 mm、平均粒径 10 µm）[注 2]

溶　離　液：リン酸（1+1,000）

流　　速：0.8 mL/min

カラム槽温度：50 °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、試料中のプロピオン酸量を算出する。

注 1　ULTRON PS-80H（信和化工製）又はこれと同等のもの

2　ULTRON PS-80G（信和化工製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

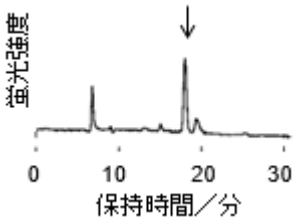
添加成分名	試料の種類	添加濃度（%）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
プロピオン酸	鶏用配合飼料	0.05	3	90.3	4.5
		0.15	3	91.3	3.3
		0.3	3	94.7	3.0
	豚用配合飼料	0.05	3	92.3	2.7
		0.15	3	92.0	5.0
		0.3	3	89.7	4.5
	牛用配合飼料	0.05	3	89.3	3.6
		0.15	3	90.7	6.1
		0.3	3	92.3	2.7

・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（%）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
プロピオン酸	肉用牛肥育用配合飼料	6	0	0.15	98.5	4.3	5.8	1.1

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　0.02 %

（参考）クロマトグラム例



添加試料（牛用配合飼料にプロピオン酸として 0.15 %相当量添加）のクロマトグラム

1.4　ガスクロマトグラフ法

（適用範囲：飼料）

A　　試薬の調製

1)　プロピオン酸標準液　　プロピオン酸〔$C_3H_6O_2$〕1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてプロピオン酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、プロピオン酸として 10 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中にプロピオン酸として 1 mg を含有するプロピオン酸標準液を調製する。

2)　クロトン酸標準液　　クロトン酸 1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加

えてクロトン酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、クロトン酸として 10 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中にクロトン酸として 1 mg を含有するクロトン酸標準液を調製する。

3) プロピオン酸－クロトン酸混合標準液　プロピオン酸標準液 5~30 mL の間の数点をそれぞれ 100 mL の全量フラスコに正確に入れる。各全量フラスコにクロトン酸標準液 10 mL ずつを正確に加え、更に標線まで水を加えて各プロピオン酸－クロトン酸混合標準液を調製する（使用時に調製する。）。

B　定　量

蒸　留　分析試料 50 g 以下の一部（プロピオン酸として 10~100 mg 相当量）を有効数字 4 桁まで量り、その数値を記録し、500 mL の丸底フラスコに入れ、水 200 mL、塩化ナトリウム 80.0 g（79.95~80.04 g）、リン酸（1+9）10 mL 及び消泡剤としてシリコン油 1~2 滴を加える。この丸底フラスコをあらかじめ水 20 mL を入れた受器を接続した水蒸気蒸留装置に連結し、留出液量が 250 mL に達するまで蒸留する。

留出液にクロトン酸標準原液 5 mL を正確に加えて振り混ぜ、メンブランフィルター（孔径 1 μm 以下）でろ過し、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ガスクロマトグラフィー　試料溶液及び各プロピオン酸－クロトン酸混合標準液各一部をガス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：水素炎イオン化検出器
カラム用管：ガラス製（内径 3 mm、長さ 2 m）
カラム充てん剤：ガスクロマトグラフィー用ケイソウ土（粒径 250~177 μm（60~80 メッシュ））[注1]
キャリヤーガス：N_2（50 mL/min）
燃料ガス：H_2（0.8 kg/cm^2）
助燃ガス：乾燥空気（2.0 kg/cm^2）
カラム槽温度：170 °C
試料導入部温度：200 °C
検出器温度：220 °C

計　算　各プロピオン酸－クロトン酸混合標準液より得られたクロマトグラムからプロピオン酸とクロトン酸とのピーク面積比を求め、プロピオン酸とクロトン酸との質量比に対する検量線を作成する。

試料溶液より得られたのクロマトグラムからプロピオン酸とクロトン酸とのピーク面積比を求め、試料中のプロピオン酸量を算出する。

注 1　Chromosorb 101（Celite Corporation 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

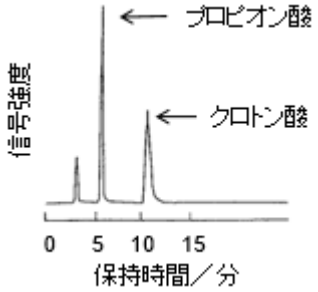
・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度（%）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
プロピオン酸	ブロイラー用配合飼料	0.05	9	95.6	10
		0.15	9	94.7	6.9
		0.3	9	98.1	4.5
プロピオン酸ナトリウム	ブロイラー用配合飼料	0.05	2	104	0.7
		0.15	2	99.5	6.4
		0.3	2	98.5	0.7
プロピオン酸カルシウム	ブロイラー用配合飼料	0.05	2	97.5	5.1
		0.15	2	92.5	2.3
		0.3	2	104	0.0

・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（%）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
プロピオン酸	配合飼料	6	0	0.2	98.5	6.2	8.7	1.7

（参考）クロマトグラム例



標準液（プロピオン酸として 200 μg/mL 及び クロトン酸として 100 μg/mL）のクロマトグラム

第 2 節　多成分分析法

1　有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

(1)　分析対象化合物　　プロピオン酸、ギ酸、クエン酸、酢酸、酒石酸、乳酸、フマル酸及びリンゴ酸（8 成分）

(2)　分析法[注1]

A　　試薬の調製

1)　プロピオン酸標準原液　　プロピオン酸カルシウム〔$C_6H_{10}CaO_4$〕1.257 g 又はプロピオン酸ナトリウム〔$C_3H_5NaO_2$〕1.297 g を量り、その数値を記録し、1,000 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてプロピオン酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、プロピオン酸としてプロピオン酸カルシウム採取量（g）に 0.7956 を乗じた量又はプロピオン酸ナトリウム採取量（g）に 0.7712 を乗じた量（mg）1 mg を含有する。）。

2)　ギ酸標準原液　　ギ酸ナトリウム〔CHO_2Na〕1.478 g を量り、その数値を記録し、1,000 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてギ酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、ギ酸としてギ酸ナトリウム採取量（g）に 0.6768 を乗じた量（mg）を含有する。）。

3) クエン酸標準原液　　クエン酸一水和物〔$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$〕1.093 g を量り、その数値を記録し、1,000 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてクエン酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、クエン酸としてクエン酸一水和物（g）に 0.9143 を乗じた量（mg）を含有する。）。

4) 酢酸標準原液　　酢酸カルシウム一水和物〔$C_4H_6O_4Ca \cdot H_2O$〕1.467 g を量り、その数値を記録し、1,000 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて酢酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、酢酸として酢酸カルシウム一水和物（g）に 0.6817 を乗じた量（mg）を含有する。）。

5) 酒石酸標準原液　　L-酒石酸〔$C_4H_6O_6$〕1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、1,000 mL の全量フラスコに入れ、標線まで水を加えて酒石酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、酒石酸として 1 mg を含有する。）。

6) 乳酸標準原液　　乳酸カルシウム五水和物〔$C_6H_{10}O_6Ca \cdot 5H_2O$〕1.711 g を量り、その数値を記録し、1,000 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて乳酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、乳酸として乳酸カルシウム五水和物（g）に 0.5844 を乗じた量（mg）を含有する。）。

7) フマル酸標準原液　　フマル酸〔$C_4H_4O_4$〕1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、1,000 mL の全量フラスコに入れ、標線まで水を加えてフマル酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、フマル酸として 1 mg を含有する。）。

8) リンゴ酸標準原液　　L-リンゴ酸〔$C_4H_6O_5$〕1.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、1,000 mL の全量フラスコに入れ、標線まで水を加えてリンゴ酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、リンゴ酸として 1 mg を含有する。）。

9) 有機酸混合標準液　　各有機酸標準原液の一部を混合し、水酸化ナトリウム溶液（0.02 mol/L）で正確に希釈し、1 mL 中に各有機酸としてそれぞれ 10~250 µg を含有する数点の有機酸混合標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液をろ紙（5 種Ａ）でろ過し、ろ液の一部を水酸化ナトリウム溶液（0.02 mol/L）で正確に希釈する。希釈液をあらかじめプラスチック製遠心沈殿管（容量 1.5 mL）を連結した限外ろ過膜（分画分子量 30,000）付きフィルターカップ[注2]に入れ、5,000×*g* で 15 分間遠心ろ過し、ろ液[注3]をキャピラリー電気泳動に供する試料溶液とする。

キャピラリー電気泳動　　試料溶液及び各有機酸混合標準液をキャピラリー電気泳動装置に注入し、間接吸光度法によりエレクトロフェログラムを得る。

測定条件　例

カ　ラ　ム：溶融石英製キャピラリーカラム（内径 50 µm、有効長 104 cm、全長 112.5 cm）[注4]

泳動緩衝液：2,6-ピリジンジカルボン酸を含む緩衝液[注5]

電　　圧：−30 kV

カラム槽温度：18 °C

試 料 注 入 法：加圧注入法（50 kPa、6 s）

検　　出　　器：紫外吸光光度検出器（検出波長：350 nm、リファレンス波長：275 nm）

カラムの洗浄：試料溶液及び各有機酸混合標準液をキャピラリー電気泳動装置に注入する前に泳動緩衝液で 4 分間以上洗浄する。

計　　算　　得られたエレクトロフェログラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の各有機酸量を算出する。

注 1　使用する水は、電気伝導率が 5.6 µS/m 以下（比抵抗が 18 MΩ·cm 以上）のものを用いる。

2　Microcon YM-30（Millipore 製（販売終了））又はこれと同等のもの

3　得られたろ液の上澄み液を試料溶液とする。

4　カラムの内径は 50 µm とし、有効長は 100~110 cm とする。

5　キャピラリー電気泳動めっき液分析用バッファ（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

添加成分名	試料の種類	添加濃度（%）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
プロピオン酸	成鶏用配合飼料	0.5	3	101	3.2
		1	3	98.7	6.5
		2	3	96.9	4.7
	子豚用配合飼料	0.5	3	88.7	3.5
		1	3	101	2.0
		2	3	99.6	2.9
	種豚用配合飼料	0.5	3	92.8	6.9
		1	3	97.0	3.7
		2	3	97.5	4.6
ギ酸	成鶏用配合飼料	0.1	3	104	2.3
		0.25	3	96.5	0.4
		0.5	3	101	3.5
	子豚用配合飼料	0.1	3	101	2.0
		0.25	3	99.2	1.1
		0.5	3	99.1	4.4
	種豚用配合飼料	0.1	3	101	12
		0.25	3	99.2	7.6
		0.5	3	100	6.1
クエン酸	成鶏用配合飼料	0.5	3	101	4.9
		1	3	99.5	8.4
		2	3	97.5	3.5
	子豚用配合飼料	0.5	3	97.0	8.2
		1	3	98.2	0.8
		2	3	99.2	3.0
	種豚用配合飼料	0.5	3	89.2	6.1
		1	3	88.4	1.0
		2	3	100	3.6

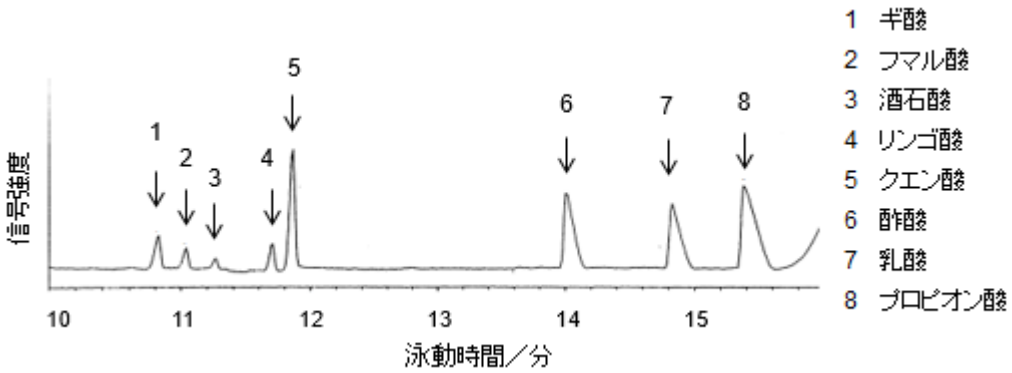
・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

添加成分名	試料の種類	添加濃度（%）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
酢酸	成鶏用配合飼料	0.1	3	99.5	7.4
		0.5	3	93.9	2.3
		1	3	90.7	8.3
	子豚用配合飼料	0.1	3	101	2.6
		0.5	3	96.2	1.7
		1	3	92.8	8.5
	種豚用配合飼料	0.1	3	99.8	1.4
		0.5	3	95.4	0.7
		1	3	90.1	1.3
酒石酸	成鶏用配合飼料	0.05	3	96.9	12
		0.1	3	104	3.4
		0.2	3	102	5.3
	子豚用配合飼料	0.05	3	85.1	5.7
		0.1	3	101	5.5
		0.2	3	97.5	3.6
	種豚用配合飼料	0.05	3	91.3	11
		0.1	3	97.8	0.8
		0.2	3	96.8	12
乳酸	成鶏用配合飼料	0.5	3	102	6.2
		1	3	98.7	6.5
		2	3	96.9	4.7
	子豚用配合飼料	0.5	3	107	8.3
		1	3	101	2.0
		2	3	99.6	2.9
	種豚用配合飼料	0.5	3	102	13
		1	3	97.0	3.7
		2	3	97.5	4.6
フマル酸	成鶏用配合飼料	0.05	3	98.8	11
		0.2	3	95.8	5.1
		2	3	97.4	3.7
	子豚用配合飼料	0.05	3	93.9	9.6
		0.2	3	98.7	4.4
		2	3	99.0	3.7
	種豚用配合飼料	0.05	3	95.7	13
		0.2	3	97.2	4.5
		2	3	98.9	2.7
リンゴ酸	成鶏用配合飼料	0.1	3	99.7	4.4
		0.2	3	95.2	6.3
		0.5	3	99.9	7.6
	子豚用配合飼料	0.1	3	97.3	14
		0.2	3	102	5.9
		0.5	3	97.5	3.6
	種豚用配合飼料	0.1	3	95.5	6.9
		0.2	3	97.8	2.7
		0.5	3	99.7	2.2

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（%）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
ギ酸	成鶏用配合飼料	3	0	0.25	92.6	2.9	6.4	1.28
クエン酸	成鶏用配合飼料	3	0	1	91.6	3.0	16	3.85
酢酸	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	90.0	2.6	9.4	2.08
酒石酸	成鶏用配合飼料	3	0	0.1	90.2	7.7	16	2.84
乳酸	成鶏用配合飼料	3	0	1	105	1.6	9.5	2.39
フマル酸	成鶏用配合飼料	3	0	0.2	87.3	4.5	5.6	1.08
プロピオン酸	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	91.4	1.8	8.6	1.91
リンゴ酸	成鶏用配合飼料	3	0	0.2	90.6	7.9	11	2.18

（参考）エレクトロフェログラム例



添加試料（成鶏用配合飼料にギ酸として 0.25 %、クエン酸及び乳酸として 1.0 %、酢酸及びプロピオン酸として 0.5 %、酒石酸として 0.1 %並びにフマル酸及びリンゴ酸として 0.2 %相当量添加）のエレクトロフェログラム

第 13 章　抗酸化剤

1　エトキシキン

(1)　配合飼料及び魚粉

A　試薬の調製

エトキシキン標準液　エトキシキン〔$C_{14}H_{19}NO$〕50 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えてエトキシキン標準原液を調製する（この液 1 mL は、エトキシキンとして 0.5 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にエトキシキンとして 0.1~6 µg を含有する数点のエトキシキン標準液を調製する。

B　定　量

抽　出　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、15 分間かき混ぜて抽出した後 3 分間静置する。抽出液の上澄み液 5 mL を 50 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、標線までメタノールを加え、メンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　試料溶液及び各エトキシキン標準液各 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：370 nm、蛍光波長：415 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 3.9 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm）[注1]

溶　離　液：ジブチルヒドロキシトルエン 0.05 g（0.045~0.054 g）をアセトニトリル－水（4+1）に溶かして 1 L とする（使用時に調製する。）。

流　　速：0.6 mL/min

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

注 1　Puresil 5µC_{18} 120Å（Waters 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

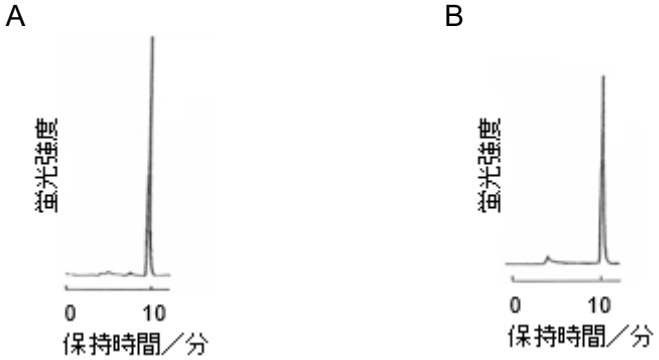
試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
子豚育成用配合飼料	50	3	96.3	1.6
	150	3	97.6	2.8
	300	3	96.2	2.7
こい育成用配合飼料	50	3	96.8	2.1
	150	3	93.6	2.1
	300	3	95.6	3.9
はまち育成用配合飼料	50	3	91.8	1.7
	150	3	94.8	3.2
	300	3	95.5	1.0
65%フィッシュミール	50	3	109	6.4
	250	3	102	7.3
	500	3	99.5	1.7
荒粕	50	3	110	2.8
	250	3	108	3.5
	500	3	98.7	1.4

・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
ます育成用配合飼料	6	0	100	101	2.4	3.4	0.42

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　1 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



試料（A：こい育成用配合飼料、B：魚粉）のクロマトグラム

(2)　油脂（その 1）

A　　試薬の調製

エトキシキン標準液　　(1)の A によりエトキシキン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一部をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中にエトキシキンとして 2~8 µg を含有する数点のエトキシキン標準液を調製する。

B　　定　　量

抽　　出　　分析試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色丸底フラスコに入れ、ピロガロール 0.50 g（0.495~0.504 g）及び水酸化カリウム・エタノール溶液（5 w/v%）100 mL を加える。この丸底フラスコに還流冷却器を接続し、80 °C の水浴上で 30 分間加熱し、油脂をけん化した後放冷する。

この液を 500 mL の褐色分液漏斗 A に入れ、先の丸底フラスコを水 20 mL ずつで

3 回洗浄し、洗液を分液漏斗 A に合わせる。更に分液漏斗 A にヘキサン 100 mL を加え、10 分間振り混ぜて抽出した後静置する。

水層（下層）を 500 mL の褐色分液漏斗 B に入れ、ヘキサン 100 mL を分液漏斗 B に加えて同様に操作し、ヘキサン層（上層）を分液漏斗 A に合わせ、水 50 mL ずつで 3 回洗浄する。ヘキサン層を三角フラスコに入れ、適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、300 mL の褐色なす形フラスコにろ紙（5 種 A）でろ過する。先の三角フラスコ及びろ紙を順次少量のヘキサンで洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせる。

ろ液を 40 °C 以下の水浴で 2~3 mL まで減圧濃縮し、更に窒素ガスを送って乾固する。アセトニトリルを加えて残留物を溶かし、この液を 100 mL の褐色全量フラスコに入れる。先のなす形フラスコを少量のアセトニトリルで洗浄し、洗液を先の全量フラスコに合わせ、更に標線までアセトニトリルを加える。この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　試料溶液及び各エトキシキン標準液各 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：370 nm、蛍光波長：415 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：アセトニトリル－水（9+1）

流　　速：0.5 mL/min

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

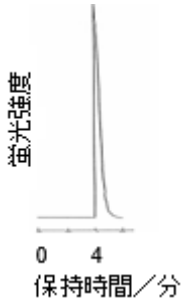
注 1　Shodex ODS pak F-411（昭和電工製（販売終了））又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
タロー	100	4	92.7	4.6
	500	4	93.5	4.0
	2,000	4	92.4	2.5
イエローグリース	100	4	96.1	3.0
	500	4	90.9	4.8
	2,000	4	91.4	5.6

（参考）クロマトグラム例



試料（イエローグリース）のクロマトグラム

(3)　油脂（その 2）

A　試薬の調製

エトキシキン標準液　(1)の A によりエトキシキン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一部をアセトニトリル－水（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中にエトキシキンとして 0.1~8 µg を含有する数点のエトキシキン標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を 50 mL の褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×*g* で 5 分間遠心分離する。上澄み液 5 mL を 100 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、標線までアセトニトリル－水（4+1）を加え、この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　　試料溶液及び各エトキシキン標準液各 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：370 nm、蛍光波長：415 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：ジブチルヒドロキシトルエン 0.05 g（0.045~0.054 g）をアセトニトリル－水（4+1）に溶かして 1 L とする（使用時に調製する。）。

流　　速：0.6 mL/min

カラム槽温度：40 °C

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

注 1　Shodex C18M 4E（レゾナック製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

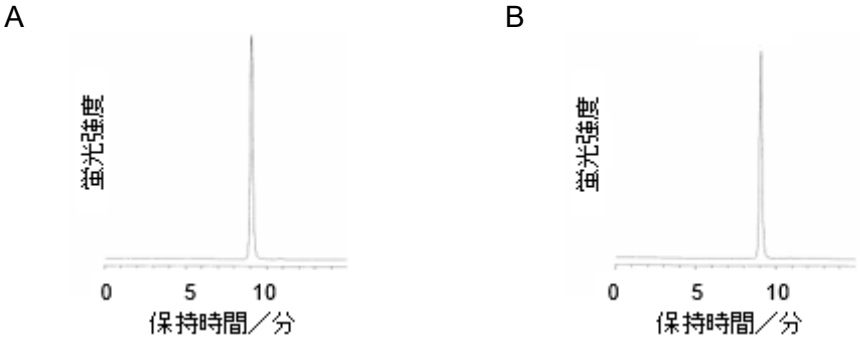
試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
イエローグリース	250	3	92.6	0.4
	500	3	92.5	0.1
	1,000	3	90.3	0.2
回収食用油	250	3	91.5	0.4
	500	3	90.9	0.2
	1,000	3	89.5	0.4
チキンオイル	250	3	91.2	0.7
	500	3	90.9	0.3
	1,000	3	90.4	0.1

・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（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
回収食用油	6	0	500	95.4	1.6	4.0	0.63

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　1 mg/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（エトキシキンとして 50 ng 注入）

B：添加試料（イエローグリースにエトキシキンとして 500 mg/kg 相当量添加）

2　ジブチルヒドロキシトルエン

(1)　配合飼料及び魚粉

A　　試薬の調製

1)　ジブチルヒドロキシトルエン標準液　　ジブチルヒドロキシトルエン〔$C_{15}H_{24}O$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてジブチルヒドロキシトルエン標準原液を調製する（この液 1 mL は、ジブチルヒドロキシトルエンとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にジブチルヒドロキシトルエンとして 2.5~15 µg を含有する数点のジブチルヒドロキシトルエン標準液を調製する。

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

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール 100 mL を加え、10 分間かき混ぜて抽出する。抽出液の上澄み液をカラムクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

カラム処理　　中性アルミナ 5 g（4.5~5.5 g）をカラム管（内径 7 mm）に乾式で充てんし、カラムを調製する。

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

液体クロマトグラフィー　　試料溶液及び各ジブチルヒドロキシトルエン標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入しクロマトグラムを得る。

測定条件　例

検　出　器：紫外吸光光度検出器（測定波長：277 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2]

溶　離　液：メタノール－水（4+1）

流　　速：1.0 mL/min

計　　算　　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し試料中のジブチルヒドロキシトルエン量を算出する。

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

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

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

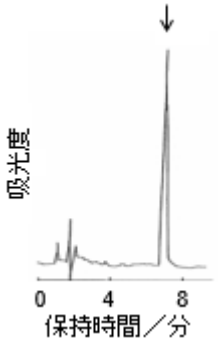
試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
ブロイラー後期用配合飼料	50	4	101	1.7
	100	4	100	1.4
子豚用配合飼料	50	4	99.4	2.1
	100	4	99.5	1.5
魚粉1	50	2	98.3	1.8
魚粉2	50	2	99.5	0.5
魚粉3	50	2	99.6	0.6

・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（mg/kg）	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	50	104	3.7	5.6	0.63

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　10 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



試料（配合飼料中）のクロマトグラム

(2)　油脂

A　　試薬の調製

(1)の A による。

B　　定　　量

抽　　出　　分析試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の分液漏斗に入れ、ヘキサン 10 mL を加えて溶かす。この液にヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL 及び酢酸 0.5 mL を加え、振り混ぜた後静置し、アセトニトリル層（下層）を 200 mL の全量フラスコに入れる。残留液にヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL 及び酢酸 0.5 mL を加え、同様に 2 回操作し、各アセトニトリル層を先の全量フラスコに合わせる。更に全量フラスコの標線までアセトニトリルを加え、メンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

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

計　　算　　(1)の B の計算の項による。

（参考）分析法バリデーション

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　1 mg/kg

3　ブチルヒドロキシアニソール

(1)　配合飼料及び魚粉

A　　試薬の調製

1)　ブチルヒドロキシアニソール標準液　　ブチルヒドロキシアニソール〔$C_{11}H_{16}O_2$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてブチルヒドロキシアニソール標準原液を調製する（この液 1 mL は、ブチルヒドロキシアニソールとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にブチルヒドロキシアニソールとして 2.5~15 μg を含有する数点のブチルヒドロキシアニソール標準液を調製する。

2)　中性アルミナ　　2 の(1)の A の 2)による。

B　定　　量

抽　　出　　2 の(1)の B の抽出の項による。

カラム処理　　2 の(1)の B のカラム処理の項による。

液体クロマトグラフィー　　試料溶液及び各ブチルヒドロキシアニソール標準液各 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：290 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（3+2）

流　　速：0.8 mL/min

計　　算　　得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のブチルヒドロキシアニソール量を算出する。

注 1　Shodex ODS pak F-411（昭和電工製（販売終了））又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

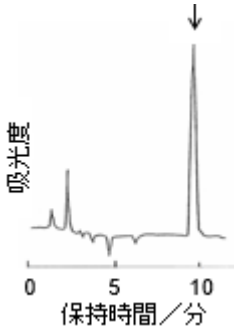
試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
ブロイラー後期用配合飼料	50	4	102	0.2
	100	4	102	0.8
子豚用配合飼料	50	4	101	0.4
	100	4	102	0.4
魚粉1	50	2	102	1.4
魚粉2	50	2	99.2	2.6
魚粉3	50	2	100	0.8

・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（mg/kg）	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	50	103	1.9	4.5	0.51

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　5 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



ブチルヒドロキシアニソールのクロマトグラム

(2)　油脂

A　試薬の調製

(1)の A による。

B　定　　量

抽　　出　　2 の(2)の B の抽出の項による。

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

計　　算　　(1)の B の計算の項による。

（参考）分析法バリデーション

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　0.5 mg/kg

第 14 章　色　素

第 1 節　各条

1　β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル

1.1　β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル及びカンタキサンチンの液体クロマトグラフによる同時分析法

（適用範囲：配合飼料）

第 2 節 1 による。

2　カンタキサンチン

2.1　β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル及びカンタキサンチンの液体クロマトグラフによる同時分析法

（適用範囲：配合飼料）

第 2 節 1 による。

第 2 節　多成分分析法

1　β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル及びカンタキサンチンの液体クロマトグラフによる同時分析法

(1)　分析対象化合物　　β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル、カンタキサンチン（2 成分）

(2)　適用範囲　　配合飼料

(3)　分析法

A　　試薬の調製

1)　β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル標準原液　　β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル[注1]〔$C_{32}H_{44}O_2$〕約 2 mg を量って 100 mL の三角フラスコに入れ、トリプシン[注2]約 5 mg 及び温水[注3] 20 mL を加え、60 °C の水浴中で 5 分間加温した後放冷する。この液に酢酸エチル 20 mL を正確に加えて 10 分間振り混ぜて抽出した後、抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 5 分間遠心分離する。

上澄み液 2.5 mL を 50 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。エタノール 10 mL を正確に加え、超音波処理により残留物を溶かして β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル標準原液を調製し、次によりその濃度を算出する。

先の上澄み液 2.5 mL を別の 50 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。シクロヘキサン 10 mL を正確に加え、超音波処理により残留物を溶かし、この液について、シクロヘキサンを対照液として波長 449 nm の吸光度を測定し、次式により標準原液の濃度を算出する。

$$C = C_B \times \frac{10{,}000}{E_{1\,\mathrm{cm}}^{1\%}}$$

C ：標準原液中の β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル濃度（μg/mL）

C_B：吸光度（449 nm）

$E_{1\,\mathrm{cm}}^{1\%}$ ：比吸光度（2,430 とする。）

2) カンタキサンチン標準原液　　カンタキサンチン[注4]〔$C_{40}H_{52}O_2$〕約 2 mg を量って 100 mL の三角フラスコに入れ、トリプシン[注2]約 5 mg 及び温水[注3] 20 mL を加え、60 °C の水浴中で 5 分間加温した後放冷する。この液に酢酸エチル 20 mL を正確に加え、10 分間振り混ぜて抽出した後、抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 5 分間遠心分離する。

上澄み液 2.5 mL を 50 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。エタノール 10 mL を正確に加え、超音波処理により残留物を溶かしてカンタキサンチン標準原液を調製し、次によりその濃度を算出する。

先の上澄み液 2.5 mL を別の 50 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。シクロヘキサン 10 mL を正確に加え、超音波処理により残留物を溶かし、この液について、シクロヘキサンを対照液として波長 470 nm の吸光度を測定し、次式により標準原液の濃度を算出する。

$$C = C_A \times \frac{10{,}000}{E_{1\,\mathrm{cm}}^{1\%}}$$

C ：標準原液中のカンタキサンチン濃度（μg/mL）

C_A ：吸光度（470 nm）

$E_{1\,\mathrm{cm}}^{1\%}$ ：比吸光度（1,970 とする。）

3) 色素混合標準液　　使用に際して、*β*-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル及びカンタキサンチン各標準原液の一部を混合し、エタノールで正確に希釈し、1 mL 中に *β*-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル及びカンタキサンチンとしてそれぞれ 0.02~2 μg を含有する数点の色素混合標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の共栓三角フラスコに入れ、トリプシン[注2]約 5 mg 及び温水[注3] 20 mL を加え、60 °C の水浴中で 5 分間加温した後放冷する。更にこの液に酢酸エチル 20 mL を正確に加え、10 分間振り混ぜて抽出した後、抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×*g* で 5 分間遠心分離する。

上澄み液 2.5 mL を正確に 50 mL のなす形フラスコに入れ、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。エタノール少量を加え、超音波処理により残留物を溶かし、この液をエタノールで 50 mL の全量フラスコに移し、更に標線までエタノールを加える。この液をプラスチック製遠心沈殿管[注5]（容量 1.5 mL）に入れ、5,000×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　　試料溶液及び各色素混合標準液各 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：470 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6]

溶　　離　　液：メタノール－アセトン（4+1）

流　　速：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計　　算　　得られたクロマトグラムから、ピーク高さ又は面積を求めて[注7]検量線を作成し、試料中の β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル量及びカンタキサンチン量を算出する。

注 1　β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル 10 %製剤（DSM 製）又はこれと同等のもの

2　トリプシン 1:250（Difco 製（販売終了））又はこれと同等のもの

3　温水の温度は 60 °C とする。

4　カンタキサンチン 10 %製剤（DSM 製）又はこれと同等のもの

5　エタノールに対し耐薬品性のあるものを用いる。

6　Shodex C18M 4E（レゾナック製）又はこれと同等のもの

7　カンタキサンチンにあっては、カンタキサンチン及びそのシス体のピーク高さ又は面積の和を求める。

（参考）分析法バリデーション

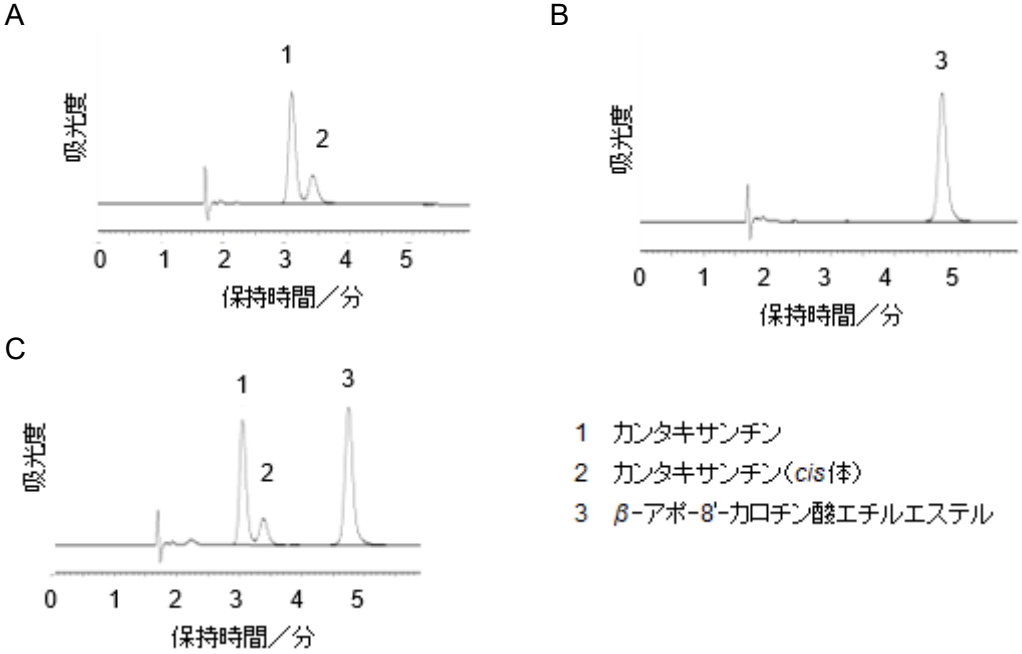
・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル	鶏用配合飼料	40	3	103	8.3
		80	3	98.4	1.9
		120	3	104	7.4
	にじます用配合飼料	40	3	105	6.1
		80	3	97.8	4.8
		120	3	100	2.9
	まだい用配合飼料	40	3	95.4	5.9
		80	3	99.3	7.1
		120	3	101	7.7
カンタキサンチン	鶏用配合飼料	40	3	96.9	2.6
		80	3	96.9	5.0
		120	3	97.5	2.6
	にじます用配合飼料	40	3	95.4	9.0
		80	3	95.0	1.7
		120	3	96.9	4.1
	まだい用配合飼料	40	3	103	5.3
		80	3	100	5.8
		120	3	98.3	7.0

・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（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル	鶏用配合飼料	7	0	80	95.4	1.6	4.0	0.48
カンタキサンチン	鶏用配合飼料	7	0	80	101	6.1	8.0	0.74

（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：標準液（β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル及びカンタキサンチンとして各 20 ng 注入）

C：添加試料（鶏用配合飼料にβ-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル及びカンタキサンチンとして各 80 g/t 相当量添加）

第 15 章　有機酸

1　ギ酸

1.1　有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

第 12 章第 2 節 1 による。

1.2　無機イオン及び有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

（適用範囲：サイレージ）

第 4 章第 2 節 1 による。

2　*iso*-吉草酸

2.1　無機イオン及び有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

（適用範囲：サイレージ）

第 4 章第 2 節 1 による。

3　*n*-吉草酸

3.1　無機イオン及び有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

（適用範囲：サイレージ）

第 4 章第 2 節 1 による。

4　クエン酸

4.1　有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

第 12 章第 2 節 1 による。

4.2　無機イオン及び有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

（適用範囲：サイレージ）

第 4 章第 2 節 1 による。

5　酢酸

5.1　有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

第 12 章第 2 節 1 による。

5.2　無機イオン及び有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

（適用範囲：サイレージ）

第 4 章第 2 節 1 による。

6　酒石酸

6.1　有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

第 12 章第 2 節 1 による。

7　乳酸

7.1　有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

第 12 章第 2 節 1 による。

7.2　無機イオン及び有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

（適用範囲：サイレージ）

第 4 章第 2 節 1 による。

8　フマル酸

8.1　有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

第 12 章第 2 節 1 による。

8.2　液体クロマトグラフ法

（適用範囲：配合飼料）

A　試薬の調製

フマル酸標準液　フマル酸〔$C_4H_4O_4$〕10 g を 0.1 mg の桁まで量り、その数値を記録し、100 mL の全量フラスコに入れ、エタノール－水（3+2）を加えて溶かし、更に標線までエタノール－水（3+2）を加えてフマル酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、フマル酸として 1 mg を含有する。）。

使用に際して、この標準原液の一部を水で正確に希釈し、1 mL 中にフマル酸として 10~50 µg を含有する数点のフマル酸標準液を調製する。

B　定　量

抽　出　分析試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、500 mL の分液漏斗に入れ、エタノール－水（3+2）250 mL を加え、20 分間振り混ぜて抽出した後、ろ紙（5 種 A）でろ過する。

ろ液の一部を水で正確に 10 倍に希釈し、メンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　試料溶液及び各フマル酸標準液各 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：210 nm）

カ　ラ　ム：強酸性陽イオン交換体カラム（内径 8.0 mm、長さ 300 mm、粒径 10 µm）[注1]

溶　離　液：リン酸（1+1,000）

流　　速：1.0 mL/min

カラム槽温度：50 °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、試料中のフマル酸量を算出する。

注 1　ULTRON PS-80H（信和化工製）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

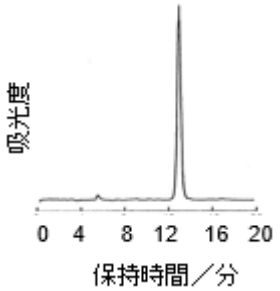
試料の種類	添加濃度（%）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
ほ乳期子豚育成用配合飼料1	0.5	3	97.5	4.8
	1.5	3	99.9	1.0
	3	3	99.4	1.7
ほ乳期子豚育成用配合飼料2	0.5	3	95.5	2.4
	1.5	3	98.4	1.5
	3	3	98.0	0.9
子豚育成用配合飼料	0.5	3	101	2.9
	1.5	3	103	3.3
	3	3	103	1.6

・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（%）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
ほ乳期子豚育成用配合飼料	6	0	1.5	96.5	2.0	2.4	0.63

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　0.02 %

（参考）クロマトグラム例



試料（子豚育成用配合飼料中）のクロマトグラム

9　*n*-ヘキサン酸

9.1　無機イオン及び有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

（適用範囲：サイレージ）

第 4 章第 2 節 1 による。

10　酪酸

10.1　無機イオン及び有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

（適用範囲：サイレージ）

第 4 章第 2 節 1 による。

11　リンゴ酸

11.1　有機酸のキャピラリー電気泳動装置による同時分析法

第 12 章第 2 節 1 による。