

(参考)

飼料分析基準等 (抜粋)

1 水分

1.1 飼料分析基準

定 量

分析試料 2~5 g を 0.1 mg の桁まで量り、アルミニウム製ひょう量皿 (あらかじめ乾燥して質量を 0.1 mg の桁まで量っておいたもの) に入れ、135±2 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、試料中の水分量を算出する。

$$\text{試料中の水分量 (\%)} = \frac{W - (W_1 - W_2)}{W} \times 100$$

W_1 : 乾燥後のアルミニウム製ひょう量皿及び試料の合計重量 (g)

W_2 : アルミニウム製ひょう量皿の重量 (g)

W : 分析に用いた試料の重量 (g)

【A 試料の試料採取量 (例)】

試料採取量 : 2 g

2 粗たん白質

2.1 飼料分析基準 (ケルダール法 (硫酸標準液吸収法及びホウ酸溶液吸収法))

A 試薬の調製

1) 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液 水酸化ナトリウム (特級) の飽和溶液を調製し、栓をして 10 日間以上静置した後、上澄み液 50 mL に煮沸冷却した水を加えて 10 L とし、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液を調製する。更に、次によりその濃度を標定する。

アミド硫酸 (標準試薬) (標準スルファミン酸) (デシケーター (減圧) 中で 48 時間乾燥したもの) 2~2.5 g を 0.1 mg の桁まで量り、250 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アミド硫酸標準液を調製する。アミド硫酸標準液 25 mL を 200 mL の三角フラスコに正確に入れ、プロモチモールブルー試液^注数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液で滴定し、次式により 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の係数 (f_1) を算出する。

$$f_1 = \frac{W \times 10^4}{V \times 97.10}$$

W : 標定に用いたアミド硫酸標準液 (25 mL) 中のアミド硫酸の重量 (g)

V : 滴定に要した 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の量 (mL)

注 プロモチモールブルー試液 プロモチモールブルー ($C_{27}H_{28}Br_2O_5S$ 、変色範囲 pH6.0 (黄) ~7.6 (青)) (特級) 0.1 g をエタノール (20 v/v%) に溶かして 100 mL とする。必要があればろ過する。

2) 0.05 mol/L 硫酸標準液 硫酸 (特級) 28 mL を水 1 L にかき混ぜながら徐々に加え、放冷後、水を加えて 10 L とし、0.05 mol/L 硫酸標準液を調製する。更に、次によりその濃度を標定する。

0.05 mol/L 硫酸標準液 25 mL を 200 mL の三角フラスコに正確に入れ、メチルレッド試液^註数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液で滴定し、次式により 0.05 mol/L 硫酸標準液の係数 (f_2) を算出する。

$$f_2 = \frac{V \times f_1}{25}$$

f_1 : 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の係数

V : 滴定に要した 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の量 (mL)

注 メチルレッド試液 メチルレッド ($C_{15}H_{15}N_3O_2$ 、変色範囲 pH4.2 (赤) ~6.2 (黄))
(特級) 0.1 g をエタノールに溶かして 100 mL とする。必要があればろ過する。

B 試料溶液の調製

分析試料 1~5 g を 0.1 mg の桁まで量り、ケルダールフラスコに入れ、硫酸カリウム (特級) 9 g 及び硫酸銅 (II) 五水和物 (特級) 1 g を加え、更に硫酸 (特級) 30~40 mL を加えて振り混ぜる。これを徐々に加熱し、発泡が収まってからは強熱し、この液が透明になってから、更に 2 時間以上加熱後放冷する。この液を水で 250 mL の全量フラスコに移し、標線まで水を加えて試料溶液とする。

C 定 量

1) 硫酸標準液に吸収させる方法 (硫酸標準液吸収法)

試料溶液の一定量をケルダールフラスコに正確に入れ、更に強アルカリ性とするのに十分な量の水酸化ナトリウム (特級) 溶液 (50 w/v%) を加える。これをあらかじめ 0.05 mol/L 硫酸標準液の一定量を正確に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 120 mL に達するまで留出させる。

留出液にメチルレッド試液数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液で滴定し、次式により窒素 [N] 量を算出する。これに 6.25 を乗じて試料中の粗たん白質量を算出する。

$$\text{窒素 [N] 量 (\%)} = 1.40 \times f_1 \times (V_1 - V_2) \times \frac{250}{V} \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

f_1 : 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の係数

V_1 : 受器に入れた 0.05 mol/L 硫酸標準液の量に相当する 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の量 (mL)

V_2 : 滴定に要した 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準液の量 (mL)

V : 蒸留に用いた試料溶液の量 (mL)

W : 分析に用いた試料の重量 (g)

2) ホウ酸溶液に吸収させる方法 (ホウ酸溶液吸収法)

受器に 0.05 mol/L 硫酸標準液の代わりにホウ酸 (特級) 溶液 (4 w/v%) の一定量を入れ、1) と同様に蒸留操作を行う。

留出液にプロモクレゾールグリーン-メチルレッド試液^註数滴を加え、0.05 mol/L 硫酸標準液で滴定し、次式により窒素 [N] 量を算出する。これに 6.25 を乗じて試料中の粗たん白質量を算出

する。

$$\text{窒素 [N] 量 (\%)} = 1.40 \times f_2 \times V_1 \times \frac{250}{V} \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

f_2 : 0.05 mol/L 硫酸標準液の係数

V_1 : 滴定に要した 0.05 mol/L 硫酸標準液の量 (mL)

V : 蒸留に用いた試料溶液の量 (mL)

W : 分析に用いた試料の重量 (g)

注 ブロモクレゾールグリーン—メチルレッド試液 ブロモクレゾールグリーン
($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$) (特級) 0.15 g 及びメチルレッド ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) (特級) 0.1 g にエタノール 180 mL を加えて溶かし、更に水を加えて 200 mL とする。

【A 試料の試料採取量等 (例)】

硫酸 30~40 mL

試料採取量 : 2 g → 250 mL (全量フラスコ)

↓

25 mL (蒸留に用いる試料溶液量)

2. 2 飼料分析基準 (燃焼法)

定 量

分析試料^{注1} 0.1~0.5 g を 0.1 mg の桁まで量り、窒素 (たん白質) 分析装置^{注2} に入れ、分析装置を作動させ窒素ガスの検出器応答ピークを得る。

同様に検量線作成用試薬^{注3} を 0.1 mg の桁まで量り、装置に入れ、窒素ガスの検出器応答ピークを得る。得られた応答ピークから面積を求めて検量線を作成し、試料中の窒素 [N] 量を算出し、窒素 [N] 量に 6.25 を乗じて試料中の粗たん白質量とする。

分析装置の必要条件

- i) 酸素ガス (純度 99.9% 以上) 中で試料を熱分解し、反応炉温度が最低 870 °C 保持できる装置
- ii) 遊離した窒素ガス (N_2) を他の燃焼生成物から分離可能な装置
- iii) 窒素酸化物 (NO_x) を窒素ガス (N_2) に変換する機構を持つこと。もしくは、窒素を NO_2 として測定可能な装置
- iv) 熱伝導度検出器により、窒素ガスを測定可能な装置

注 1 分析試料は、必要に応じ、均一な試料の適量を微粉碎し、全量が 0.5 mm の網ふるいを通じたもの (本試験では、この操作は必要ありません。)

2 燃焼法に基づく装置を用い、当該装置に適した条件で測定する。

3 エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物、DL-アスパラギン酸等使用する窒素 (たん白質) 分析装置指定の試薬を用いる。

3 粗脂肪

3. 1 飼料分析基準 (ジエチルエーテル抽出法)

定 量

分析試料 2~5 g を 0.1 mg の桁まで量り、円筒ろ紙^{注1}（直径 22 mm、高さ 90 mm）に入れ、その上に脱脂綿を軽く押えるようにして入れた後、95~100 °C で 2 時間乾燥する。

これをソックスレー抽出器に入れ、脂肪ひょう量瓶（あらかじめ 95~100 °C で乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量っておいたもの）に連結し、ジエチルエーテルを加えて 16 時間抽出する^{注2}。

次に、円筒ろ紙をとり去り、ジエチルエーテルを回収する。脂肪ひょう量瓶をはずしてジエチルエーテルを揮散させ、95~100 °C で 3 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、試料中の粗脂肪量を算出する。

注 1 No.84（東洋濾紙製）又はこれと同等のもの。

2 同等の抽出効果のある装置を用いてもよい。

【A 試料の試料採取量（例）】

試料採取量：2 g

4 粗繊維

4. 1 飼料分析基準（静置法）

定 量

分析試料 2~5 g を 0.1 mg の桁まで量り、500 mL のトールビーカーに入れ、硫酸（1+34）50 mL を加え、更に水を加えて 200 mL とする。

次に、トールビーカーを時計皿又は冷却器で覆い、蒸発する水分を補いながら 30 分間煮沸した後、水 300 mL を加えて一夜放置し、上澄み液を吸引除去し、再び水を加えて 200 mL とし、以下同様に操作する。

残留物（酸不溶解物）に水酸化ナトリウム溶液（5 w/v%）50 mL を入れ、水を加えて 200 mL とし、時計皿又は冷却器で覆い、以下酸処理の場合と同様に操作する。

残留物（酸・アルカリ不溶解物）をろ紙（5 種 A）（あらかじめアルミニウム製ひょう量皿に入れ、135±2 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量っておいたもの）でろ過する。ろ紙上の残留物をろ液のアルカリ性反応がなくなるまで熱水で洗浄し、更に少量のエタノール及びジエチルエーテルで順次 2~3 回ずつ洗浄した後、3~4 時間風乾する。

次に、酸・アルカリ不溶解物をろ紙とともに先のひょう量皿に入れ、135±2 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、試料中の酸・アルカリ不溶解物の量を算出する。ひょう量皿内の残留物をろつぼ（あらかじめ 550~600 °C で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量っておいたもの）に入れる。これを穏やかに加熱して炭化させた後、550~600 °C で 2 時間加熱して灰化し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、試料中の灰分量を求める。

酸・アルカリ不溶解物の量より灰分量を差し引いて試料中の粗繊維量を算出する。

4. 2 飼料分析基準（ろ過法）

定 量

分析試料 2~5 g を 0.1 mg の桁まで量り、500 mL のトールビーカーに入れ、硫酸（1+34）50 mL を加え、更に水を加えて 200 mL とし、時計皿又は冷却器で覆い、蒸発する水分を補いながら 30 分間煮沸した後、残留物を 0.045 mm のステンレス金網でろ過し、熱水で洗浄する。

残留物（酸不溶解物）を水 130~140 mL で先のトールビーカーに移し、水酸化ナトリウム溶液（5

w/v%) 50 mL を加え、更に水を加えて 200 mL とする。

次に、トールビーカーを時計皿又は冷却器で覆い、蒸発する水分を補いながら 30 分間煮沸する。

残留物（酸・アルカリ不溶解物）をろ紙（5 種 A）（あらかじめアルミニウム製ひょう量皿に入れ、 135 ± 2 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量っておいたもの）でろ過する。ろ紙上の残留物をろ液のアルカリ性反応がなくなるまで熱水で洗浄し、更に少量のエタノール及びジエチルエーテルで順次 2~3 回ずつ洗浄した後、3~4 時間風乾する。

次に、酸・アルカリ不溶解物をろ紙とともに先のひょう量皿に入れ、 135 ± 2 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、試料中の酸・アルカリ不溶解物の量を算出する。ひょう量皿内の残留物をろつぼ（あらかじめ $550 \sim 600$ °C で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量っておいたもの）に入れる。これを穏やかに加熱して炭化させた後、 $550 \sim 600$ °C で 2 時間加熱して灰化し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、試料中の灰分量を求める。

酸・アルカリ不溶解物の量より灰分量を差し引いて試料中の粗繊維量を算出する。

【A 試料の試料採取量（例）】

試料採取量：2 g

5 粗灰分

5. 1 飼料分析基準

定 量

分析試料 2~5 g を 0.1 mg の桁まで量り、ろつぼ（あらかじめ $550 \sim 600$ °C で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量っておいたもの）に入れる。これを穏やかに加熱して炭化させた後、 $550 \sim 600$ °C で 2 時間加熱して灰化し、デシケーター中で放冷後、質量を 0.1 mg の桁まで量り、試料中の粗灰分量を算出する。

【A 試料の試料採取量（例）】

試料採取量：2 g

6 カルシウム

6. 1 飼料分析基準（シュウ酸アンモニウム法）

A 試薬の調製

0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム標準液 過マンガン酸カリウム（特級）3.16 g を量ってビーカーに入れ、水 800 mL を加えて煮沸し、放冷後、水で 1,000 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えた後 1~2 日間静置する。この液をガラスろ過器（G4）でろ過し、0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム標準液を調製し、次によりその濃度を標定し、褐色瓶に保存する。

シュウ酸ナトリウム（標準試薬）（ $150 \sim 200$ °C で 1~1.5 時間乾燥したもの）2 g を 0.001 g の桁まで量り、250 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シュウ酸ナトリウム標準液を調製する。シュウ酸ナトリウム標準液 10 mL を 200 mL の三角フラスコに正確に入れ、あらかじめ煮沸した後、 $25 \sim 30$ °C に放冷した硫酸（特級）（1+20）70 mL を加える。穏やかにかき混ぜながら 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム標準液 10 mL を急速に加え、過マンガン酸の色が完全に消失した後、70 °C に加熱し、更に 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム標準液で滴定を続ける。終点近くでは 1~1.5 mL を徐々に加え、溶液が微紅色となったとき（着色して 30 秒以内に消失するものであってはならない。）を終点として 0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム標

た後 30 分間放置し、波長 400~420 nm 付近の吸光度を次の示差法により測定する。

採取した試料溶液中のリン量より少ないリン量のリン標準液及び採取した試料溶液中のリン量より多いリン量のリン標準液各 10 mL をそれぞれ 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、適量の水で希釈する。これらの液を試料溶液の場合と同様に発色させてそれぞれ第一標準液及び第二標準液とする。第一標準液を対照液として、第二標準液及び試料溶液の吸光度を測定し、試料中のリン量を算出する。

注 1 リン標準液の濃度例 (10 mL 中に 0.5 mg、1.0 mg、1.5 mg、2.0 mg、2.5 mg、3.0 mg、3.5 mg 及び 4.0 mg)

2 フェノールフタレイン試液 フェノールフタレイン ($C_{20}H_{14}O_4$ 、変色範囲 pH8.3 (無色) ~10.0 (紅色)) (特級) 1 g をエタノールに溶かして 100 mL とする。

【A 試料の試料採取量等 (例)】

塩酸 10 mL、水 20 mL
試料採取量 : 4 g → 250 mL (全量フラスコ)
↓ 適量の水、発色試液 20 mL
25 mL → 100 mL
(全量フラスコ)

8 銅

8. 1 飼料分析基準^{注1}

A 試薬の調製

銅標準液^{注2} 銅 (標準試薬) (酢酸 (特級) (1+49)、水及びエタノール (特級) で順次洗浄したもの) 1 g を 0.001 g の桁まで量り、トールビーカーに入れ、硝酸 5 mL を加えて溶かし、塩酸 5 mL を加えて沸騰水浴上で加熱し、蒸発乾固する。塩酸 (6 mol/L)^{注3} 10 mL を加えて残留物を溶かし、この液を水で 1,000 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えて銅標準原液を調製する (この液 1 mL は、銅 [Cu] として 1 mg を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量を塩酸 (0.1 mol/L) で正確に希釈し、1 mL 中に銅として 0.5~5 µg を含有する数点の銅標準液^{注4} を調製する。

B 試料溶液の調製

分析試料 1~5 g を 0.001 g の桁まで量り、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、塩酸 (1 mol/L) 100 mL を正確に加え、30 分間かき混ぜて抽出した後、遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

C 定 量

試料溶液の一定量 (銅として 0.05~0.5 mg 相当量) を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで塩酸 (0.1 mol/L) を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長 324.8 nm の吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各銅標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中の銅量を算出する。

【D 試料の試料採取量等（例）】

試料採取量：2 g → 100 mL（塩酸（1 mol/L））
↓ 塩酸（0.1 mol/L）
5 mL → 100 mL（全量フラスコ）
↓ 塩酸（0.1 mol/L）
10 mL → 100 mL
（全量フラスコ）

10 クエン酸モランテル

10.1 飼料分析基準^{注1}

A 試薬の調製

クエン酸モランテル標準液 クエン酸モランテル [C₁₈H₂₆N₂O₈S] 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、250 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノール（特級）を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてクエン酸モランテル標準原液を調製する（この液 1 mL は、クエン酸モランテルとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノール（特級）で正確に希釈し、1 mL 中にクエン酸モランテルとして 0.5~7 µg を含有する数点のクエン酸モランテル標準液^{注2}を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 3~5 g（クエン酸モランテルとして 6~60 mg 相当量）を 0.001 g の桁まで量り、200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール（特級）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、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（特級）で正確に希釈する。この液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）^{注3}でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各クエン酸モランテル標準液各 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：紫外吸光光度検出器（測定波長：320 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4}

溶離液^{注5}：リン酸緩衝液^{注6}－アセトニトリル（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面積を求めて検量線を作成し、試料中のクエン酸モランテル量を算出する。

注1 定量操作は暗室で行い、ガラス容器等はアルミ箔等で被覆する。

2 クエン酸モランテル標準液の濃度例（1 mL 中に 0.5 µg、1 µg、3 µg、5 µg 及び 7 µg）

3 PTFE 製等クエン酸モランテルの吸着性のないもの

4 Shodex C₁₈-5B（昭和電工製）又はこれと同等のもの

5 液体クロマトグラフ用試薬又はこれと同等のもの

6 リン酸二水素カリウム 6.8 g を水に溶かして 1 L とし、リン酸（1+10）で pH を 3.3 に調整する。

【D試料の試料採取量等（例）】

試料採取量：3 g → 100 mL（メタノール）
↓ メタノール
10 mL → 100 mL（全量フラスコ）
↓ メタノール
5 mL → 100 mL（全量フラスコ）

1.1 モネンシンナトリウム

1.1.1 迅速定量法及びフローインジェクション法

A 試薬の調製

- 1) 標準モネンシンナトリウム液 飼料分析用標準モネンシンナトリウム 12 mg(力価)を 100 mL の全量フラスコに正確にとり、無水エタノール^{注1}を加えて溶かし、100 mL として標準モネンシンナトリウム原液を調製する（この液 1 mL はモネンシンナトリウム 120 µg(力価)を含有する。）。
使用に際して、標準原液の一定量を無水エタノールで正確に 20 倍に希釈する（この液 1 mL はモネンシンナトリウム 6 µg(力価)を含有する。）。
標準原液は冷暗所に保存し、2 週間以内に使用する。
- 2) *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド液 *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド（特級）600 mg を約 50 mL の無水エタノールに溶かした後、硫酸（特級）1 mL を徐々に加え、更に無水エタノールを加えて 100 mL とする（使用時に調製する。）。
- 3) 硫酸－無水エタノール液 約 30 mL の無水エタノールに硫酸（特級）1 mL を徐々に加え、更に無水エタノールを加えて 100 mL とする（使用時に調製する。）。

B 定 量^{注2}

抽出 分析試料 10 g を 200 mL の共栓三角フラスコにとり、無水エタノール 100 mL を加え、マグネチックスターラーで 10 分間かき混ぜてモネンシンナトリウムを抽出し、直ちにろ過して試料溶液とする。

測定 試料溶液 10 mL ずつを 50 mL の共栓試験管 A、B 及び C にそれぞれ正確にとり、共栓試験管 A 及び B にそれぞれ無水エタノール 5 mL、共栓試験管 C に標準液 5 mL を正確に加え、更に共栓試験管 A に硫酸－無水エタノール液 5 mL、共栓試験管 B 及び C にそれぞれ *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド液 5 mL を正確に加え^{注3}混合した後、70±1 °C の恒温槽中で 20 分間加温して発色させる。放冷後、共栓試験管 A、B 及び C 液について無水エタノールを対照液として波長 578 nm 付近でそれぞれ吸光度 a、b 及び c を測定する^{注4}。

計算 次式によりモネンシンナトリウムの含量を算出する。

$$\text{試料中のモネンシンナトリウム含量 (g(力価)/トン)} = \frac{b-a}{c-b} \times 30$$

注 1 無水エタノールは試薬特級を用いる。

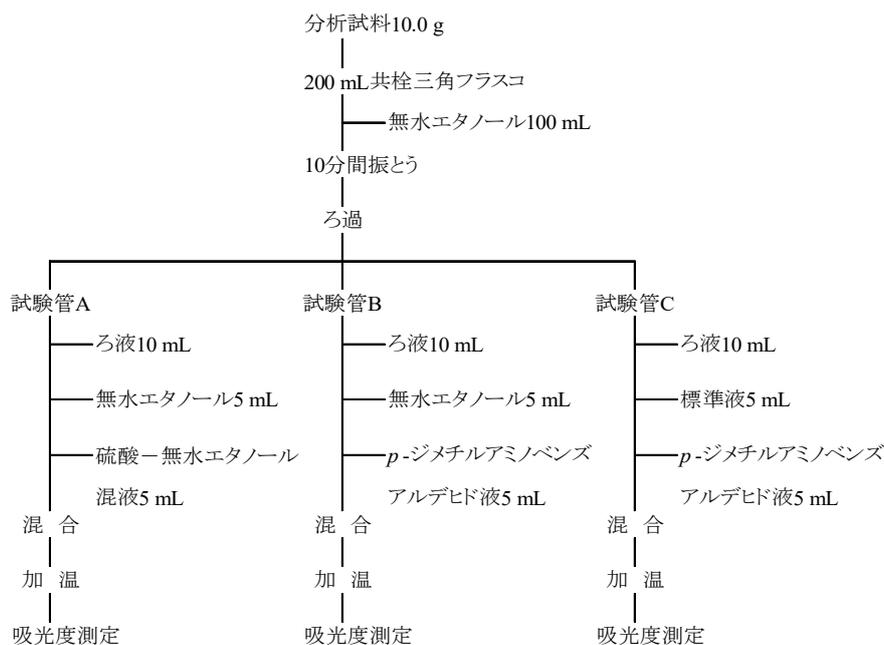
2 定量操作中は直射日光を避け、また、水が混入しないように注意すること。

3 硫酸－無水エタノール液及び *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド液は最後に加えることとし、加えた後の操作は速やかに行うこと。

4 今回は試料と同一の原料組成のモネンシンナトリウム無添加試料のブランク値の測定は省略するものとする。

なお、定量操作にフローインジェクション装置を用いた場合、報告様式中の分析法はフローインジェクション法とする。

【A 試料の試料採取量等（例）】



1 1 . 2 飼料分析基準（液体クロマトグラフ法）

A 試薬の調製

モネンシンナトリウム標準液 常用標準モネンシン 20 mg(力価)相当量を有効数字 3 桁まで量り、100 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてモネンシンナトリウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、モネンシンナトリウムとして 0.2 mg(力価)を含有する。）。

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

B 定 量

抽出 分析試料 10.0 g を有効数字 3 桁まで量り、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水（9+1）100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出し、抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過する。ろ液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各モネンシン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：紫外可視吸光度検出器（測定波長：520 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）^{注2}

溶離液^{注3}：メタノール-水-酢酸（940+60+1）

反応液^{注4}：硫酸 10 mL をメタノール^{注3}475 mL にかき混ぜながら徐々に加えた後、バニリン（98.0 %以上）15 g を加えて溶かす（用時調製する。）。

流速：溶離液 0.6 mL/min 反応液 0.6 mL/min

反応槽温度：95 °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、試料中のモネンシナトリウム量^{注5}を算出する。

注1 モネンシナトリウム標準液の濃度例（1 mL 中に 0.5 μg(力価)、1 μg(力価)、2 μg(力価)、4 μg(力価)、6 μg(力価)及び 8 μg(力価)）

2 Mightysil RP-18 GP（関東化学製）又はこれと同等のもの

3 液体クロマトグラフ用試薬又はこれと同等のもの

4 反応槽内の反応コイル（内径 0.5 mm、長さ 5 m、ステンレス製）中でカラムから溶出した溶離液に反応液を合わせて発色させた後、直ちに紫外可視吸光度検出器に送る。反応液は、遮光容器に入れて使用すること。

5 モネンシンA（標準液のクロマトグラフに現れる主要なピーク。試料溶液のクロマトグラフにおいては、標準液のモネンシンAと同じ保持時間に現れるピーク。）量をモネンシナトリウム量とする。

【A 試料の試料採取量等（例）】

試料採取量 10 g → 100 mL（メタノール-水（9+1））

11.3 飼料分析基準（微生物学的定量法）

A 試薬等の調製

1) 希釈溶媒 水-メタノール（7+3）

2) モネンシン標準液 常用標準モネンシン 40 mg 以上を有効数字 3 桁まで量り、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、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^{注1}する。

3) 培地 F-22 号培地

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

培地 1,000 mL あたりの組成及び pH

培地番号	F-22
酵母エキス (g)	2.5
ブドウ糖 (g)	10
硫酸マグネシウム (g)	50
カンテン ^{注2} (g)	13~20
水	適量

滅菌後のpH	5.9~6.1
--------	---------

- 4) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。
- 5) 寒天平板 円筒法による。
- 6) 抽出溶媒 メタノール-水 (9+1)

B 試料液の調製

分析試料の一定量 (MN として 0.3 mg(力価)相当量) を有効数字 3 桁まで量り、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。

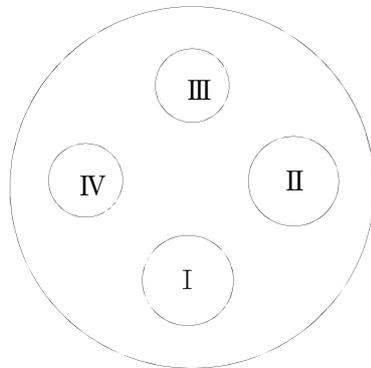
ろ液をカラム (カラム管 (内径 14 mm) にカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ^{註3} (粒径 74~177 μm (200~80 メッシュ)) 12 g を乾式で充てんしたもの) に入れ、初めの流出液 5 mL を捨てる。

その後の流出液の一定量を水で正確に希釈し、2 μg (力価)/mL の高濃度試料液を調製し、更にこれを希釈溶媒で正確に希釈して 0.5 μg (力価)/mL の低濃度試料液を調製する。

C 定 量

2-2 用量法による。

分 注 寒天平板 5 枚をとり、図のように、各寒天平板の第 I の円筒には高濃度標準液 (S_H)、第 II の円筒には高濃度試料溶液 (U_H)、第 III の円筒には低濃度標準液 (S_L)、第 IV の円筒には低濃度試料溶液 (U_L) をそれぞれ 0.25 mL ずつ分注する。



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

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

(単位 : mm)

番 号	I	III	II	IV
内 容	高濃度標準液 (S _H)	低濃度標準液 (S _L)	高濃度試料溶液 (U _H)	低濃度試料溶液 (U _L)
寒天平板				

