

# 飼料研究報告

第42号

平成29年

## Research Report of Animal Feed

Vol. 42  
2017



独立行政法人 農林水産消費安全技術センター  
Food and Agricultural Materials Inspection Center  
(Incorporated Administrative Agency)  
OIE Collaborating Centre for Animal Feed Safety and Analysis  
Saitama, Japan



## はしがき

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）は、平成19年4月、肥料・飼料、農薬、食品のそれぞれを担っていた3つの検査・分析機関が、共通する科学的技術を基盤に統合し“農場から食卓まで”の一貫した食の安全と消費者の信頼の確保を担う機関として新たな一步を踏み出しました。これまでの10年の歩みは統合のメリットを打ち出し、それぞれの機関で蓄えてきた知見と経験を合わせ、様々な課題に取り組んできました。10年を経たこれからは、より質の高い技術力で行政を支える第一線の検査分析機関として更に飛躍するべく努力を続ける所存です。

飼料及びペットフードについては、農林水産省等の関係府省が「飼料安全法」及び「ペットフード安全法」に基づく基準規格（残留農薬、有害物質、添加物など）を設定し、飼料等の関係事業者がこの基準規格を遵守することにより、飼料等の安全確保が図られています。これらの法律に基づく基準規格の設定に当たっては、先ずはその目的に応じた性能（選択性、検量線の直線性、真度、精度、検出限界と定量限界など）を有する試験法により、科学的に信頼できるデータを得ることが重要です。このため、FAMICでは飼料等の分析法の開発、改良等を行うとともに、分析法の妥当性確認を行って、公定分析法を確立しています。また、確立した公定分析法を用いて飼料等のサーベイランス・モニタリングを行い、有害物質による汚染実態の把握や基準規格の遵守状況の確認を行うことを通じて、飼料等の安全確保に貢献しています。また、FAMICの飼料部門は、国際獣疫事務局（OIE）の「飼料の安全と分析」分野のコラボレーティング・センターとして、飼料の安全と分析に関する技術情報の発信や研修等の実施などを通じて、安全な畜産物の国際取引の確保等に寄与しています。

『飼料研究報告』は、FAMICの飼料部門における飼料及び飼料添加物並びにペットフードの分析及び鑑定技術の改善、検査手法・試験法の開発又は改良等を目指して実施した調査・研究成果や学術雑誌等に投稿等して公表した研究成果を取りまとめたものです。これらの研究成果は「飼料分析基準」（平成20年4月1日付け19消安第14729号。農林水産省消費・安全局長通知）又は「愛玩動物用飼料等の検査法」（平成21年9月1日付け21消技第1764号。FAMIC理事長制定）に記載されるほか、『飼料分析法・解説 -2009-』（飼料分析基準研究会編書）の改訂の際に掲載される予定です。

最後に、本研究報告が飼料及び飼料添加物並びにペットフードの安全の確保の一助となることを期待するとともに、関係各位の皆様には、FAMICの技術レベルの更なる向上のために、引き続き、御指導、御鞭撻を賜りますよう、お願い申し上げます。

平成29年9月

理事長 木村 真人

## 謝 辞

本報告に掲載した分析法の開発及び報告書の作成に当たり、助言賜りました下記の飼料分析基準検討会の各委員に感謝申し上げます。

平成 28 年度飼料分析基準検討会委員  
(敬称略。五十音順。役職は平成 29 年 3 月現在。)

- |        |  |
|--------|--|
| 石黒 瑛一  | 一般財団法人日本食品分析センター 顧問  |
| 内田 一成  | 一般財団法人生物科学安全研究所 事業部 部長代行   |
| 永西 修   | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構<br>畜産研究部門 家畜代謝栄養研究領域<br>精密栄養管理ユニット 主席研究員 |
| 小田中 芳次 | 公益財団法人日本植物調節剤研究協会 研究所 技術顧問                                       |
| 小池 良治  | 農林水産省動物医薬品検査所 検査第二部 総括上席研究官                                      |
| 後藤 哲久  | AOAC インターナショナルフェロー   |
| 中島 正博  | 名古屋市衛生研究所 食品部長   |
| 永山 敏廣  | 明治薬科大学 薬学部 教授  |
| 堀江 正一  | 大妻女子大学 家政学部 食物学科 教授  |
| 松井 徹   | 国立大学法人京都大学大学院 農学研究科 教授   |
| 松井 利郎  | 国立大学法人九州大学 農学研究院 教授  |
| 安井 明美  | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構<br>食品研究部門 アドバイザー                         |

# 目 次

1 稲発酵粗飼料中のベンフレセート及びシハロホップブチルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法の確立 佐藤 梢, 新井 詠子, 風間 鈴子 .....	1
---	---

## 技術レポート

1 飼料中のカルバリル, カルボフラン及びフェノブカルブの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法の開発 田中 里美, 桑原 正良 .....	20
2 飼料中の 3-OH カルボフランの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発 保田 伊世, 長久保 眞平 .....	34
3 飼料中のイミダクロプリドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の妥当性確認 中村 哲, 井上 智江 .....	47
4 農薬のガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法の妥当性確認 ～ブロモブチド代謝物への適用～ 榊原 良成, 若宮 洋市 .....	56
5 愛玩動物用飼料等の検査法収載法のスナック製品への適用のための妥当性確認 ～有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法～ 鈴木 知華, 奥富 幸, 高橋 亜紀子 .....	69
6 どうもろこしサイレージ中のかび毒の定量法に関する検討 ～アフラトキシン B <sub>1</sub> , ゼアラレノン及びデオキシニバレノール～ 伊藤 千晶, 佐藤 憲大 .....	87
7 飼料を対象とするサルモネラ試験法の選択増菌培地液量の減量化に関する検討 奥村 寿章, 加藤 まどか, 関口 好浩, 三枝 尚子, 宮野谷 杏, 名塚 英一, 内山 丈, 千原 哲夫, 橋本 亮 .....	101

## 精度管理

- 1 平成 28 年度飼料等の共通試料による分析鑑定について  
鈴木 知華, 船水 悦子, 新井 詠子, 加藤 まどか,  
安田 紗紀恵, 矢野 愛子 ..... 112

## 調査資料

- 1 飼料中の有害物質等のモニタリング等の結果について (平成 28 年度)  
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課 ..... 140
- 2 特定添加物検定結果等について (平成 28 年度)  
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課 ..... 163

## 他誌掲載論文 (抄録)

- 1 Development and inter-laboratory study of a method for quantifying zearalenone in pet foods  
M. Nomura, T. Wada, T. Ishibashi, T. Komoriya, T. Nagahara,  
T. Chihara  
(World Mycotoxin Journal, 9 (4), 497-503 (2016).) ..... 177

## CONTENTS

1	Development and Validation of Simultaneous Determination Method of Benfuresate and Cyhalofop-butyl in Whole-crop Rice Silage by LC-MS/MS	Kozue SATOU, Eiko ARAI and Reiko KAZAMA .....	1
§ Technical report			
1	Development of Simultaneous Determination Method of Carbaryl, Carbofuran and Fenobucarb in Feed by LC-MS/MS	Satomi TANAKA and Masayoshi KUWABARA .....	20
2	Development of Determination Method of 3-Hydroxycarbofuran in Feed by LC-MS/MS	Iyo YASUDA and Shinpei NAGAKUBO .....	34
3	Method Validation of the Determination Method of Imidacloprid by LC-MS for Wheat, Rice Straw and Whole-crop Rice Silage	Satoru NAKAMURA and Tomoe INOUE .....	47
4	Validation Study on Analyte Expansion to the Simultaneous Determination Method of Pesticides in Feed by GC-MS for Debromo Metabolite of Bromobutide	Yoshinari SAKAKIBARA and Youichi WAKAMIYA .....	56
5	Validation Study on Application of the Simultaneous Determination Method of Organochlorine Pesticides by GC to Snack Type Pet Food	Chika SUZUKI, Yuki OKUTOMI and Akiko TAKAHASHI .....	69
6	Study of Determination Methods of Mycotoxins in Corn Silage ~ Aflatoxin B <sub>1</sub> , Zearalenone and Deoxynivalenol ~	Chiaki ITO and Norihiro SATO .....	87
7	Improvement of Selective Enrichment for Detection Method of Salmonella in Feed ~ Reduction of the Volume of Selective Enrichment Broth ~	Toshiaki OKUMURA, Madoka KATO, Yoshihiro SEKIGUCHI, Naoko SAEGUSA, Kyou MIYANOYA, Eiichi NAZUKA, Takeshi UCHIYAMA, Tetsuo CHIHARA and Sayaka HASHIMOTO .....	101

## § Proficiency test

### 1 Proficiency Test (in the Fiscal Year 2016)

Chika SUZUKI, Etsuko FUNAMIZU, Eiko ARAI,  
Madoka KATO, Sakie YASUDA and Aiko YANO ..... 112

## § Investigative report

### 1 Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2016)

Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed  
Inspection Department ..... 140

### 2 Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2016)

Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection  
Department ..... 163

## § Papers accepted in other journals (abstract)

### 1 Development and inter-laboratory study of a method for quantifying zearalenone in pet foods

M. Nomura, T. Wada, T. Ishibashi, T. Komoriya, T. Nagahara,  
T. Chihara  
(World Mycotoxin Journal, 9 (4), 497-503 (2016).) ..... 177

# 1 稲発酵粗飼料中のベンフレセート及びシハロホップブチルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法の確立

佐藤 梢<sup>\*1</sup>, 新井 詠子<sup>\*1</sup>, 風間 鈴子<sup>\*2</sup>

## Development and Validation of Simultaneous Determination Method of Benfuresate and Cyhalofop-butyl in Whole-crop Rice Silage by LC-MS/MS

Kozue SATOU<sup>\*1</sup>, Eiko ARAI<sup>\*1</sup> and Reiko KAZAMA<sup>\*2</sup>

(<sup>\*1</sup> Sendai Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

<sup>\*2</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

An analytical method was developed to simultaneously determine the levels of benfuresate and cyhalofop-butyl in whole-crop rice silage (WCRS) using a liquid chromatograph-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometer (LC-APCI-MS/MS).

After adding water to the sample, benfuresate and cyhalofop-butyl were extracted with acetone and the extracted solutions were filtered. The filtrate was purified with two types of SPE columns (InertSep K-solute, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan and ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA), and injected into the LC-APCI-MS/MS to determine the levels of benfuresate and cyhalofop-butyl. LC separation was carried out on an ODS column (Inertsil ODS-3, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 μm from GL Sciences Inc.) using a gradient with 0.1 v/v% formic acid aqueous solution and 0.1 v/v% formic acid methanol solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode atmospheric pressure chemical ionization (APCI+) was used.

Recovery tests were conducted on WCRS spiked with benfuresate at the levels of 0.009 or 0.2 mg/kg original matter and cyhalofop-butyl at the levels of 0.009 or 0.1 mg/kg original matter. The resulting mean recoveries ranged from 86.0 % to 101 % for benfuresate and 85.3 % to 93.2 % for cyhalofop-butyl. The repeatability in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>) were not more than 12 % for benfuresate and 14 % for cyhalofop-butyl.

A collaborative study was conducted in eleven laboratories using two kinds of WCRS. One WCRS was spiked with 0.2 mg/kg air-dry matter of benfuresate and 0.1 mg/kg air-dry matter of cyhalofop-butyl. The other of WCRS was spiked with 0.02 mg/kg air-dry matter of benfuresate and cyhalofop-butyl. The resulting mean recoveries, RSD<sub>r</sub>, reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>R</sub>), and HorRat, respectively for two kinds of spiked WCRS, were 96.1 % and 94.7 %, 2.6 % and 3.7 %, 8.1 % and 10 %, and not more than 0.45 for benfuresate, and 92.7 % and 97.0 %, 2.7 % and 4.8 %, 22 % and 32 %, and not more than 1.5 for cyhalofop-butyl.

This method was validated and established for use in the inspection of benfuresate and cyhalofop-butyl in whole-crop rice silage.

Key words: benfuresate; cyhalofop-butyl; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); atmospheric pressure chemical ionization (APCI); whole-crop rice silage; collaborative study

<sup>\*1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

<sup>\*2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

キーワード：ベンフレセート；シハロホップブチル；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；大気圧化学イオン化法；稲発酵粗飼料；共同試験

## 1 緒 言

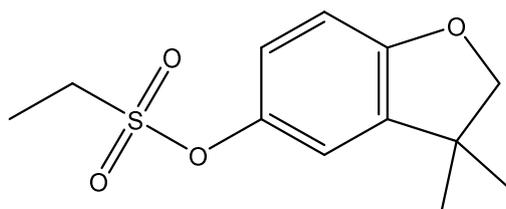
ベンフレセートは、Schering Agrochemicals（英国）により開発されたベンゾフラニルアルキルスルホン酸系除草剤であり、作用機構の詳細は解明されていないが、炭素数 18 以上の長鎖の脂肪酸の合成阻害と考えられており、湛水処理及び土壌処理により殺草活性を示す<sup>1)</sup>。我が国では、1994 年より水稻、芝を対象に農薬登録されており、飼料中の管理基準値<sup>2)</sup>として、稲わらで 0.3 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で 0.2 mg/kg が設定されている。

シハロホップブチルは、The Dow Chemical Company（米国）により開発されたアリルオキシフェノキシ構造を有する除草剤であり、その作用機構は、アセチル CoA カルボキシラーゼを阻害することによる脂肪酸の生合成の阻害である<sup>3)</sup>。我が国では 1996 年に水稻を対象に農薬登録されており、飼料中の管理基準値<sup>2)</sup>として、稲わら及び粃米で 2 mg/kg、WCRS で 0.1 mg/kg が設定されている。

平成 24 年度に、筆者らは、財団法人日本食品分析センターが平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業において開発したガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）による飼料中のシハロホップブチル及びベンフレセートの分析法<sup>4)</sup>（以下「JFRL 法」という。）を基に、飼料用イネ（稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米）を対象として飼料分析基準<sup>5)</sup>への適用の可否を検討し、稲わら及び粃米に適用可能な定量法（以下「GC-MS 法」という。）を確立した<sup>6)</sup>。その際、WCRS についても検討したが、回収率が高い傾向にあり、更なる検討が必要であった<sup>6)</sup>。

そこで、今回、GC-MS 法を基に、WCRS 中のベンフレセート及びシハロホップブチルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による同時定量法を開発し、飼料分析基準への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

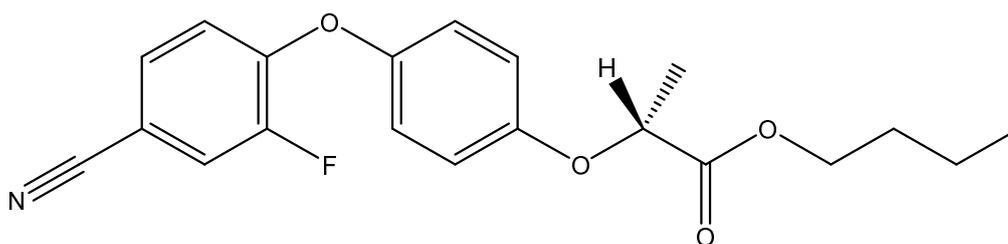
参考にベンフレセート及びシハロホップブチルの構造式等を Fig. 1 に示した。



**Benfuresate**

2,3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran-5-yl ethanesulfonate

$C_{12}H_{16}O_4S$  MW: 256.3 CAS No.: 68505-69-1



**Cyhalofop-butyl**

butyl (*R*)-2-[4-(4-cyano-2-fluorophenoxy)phenoxy]propionate

$C_{20}H_{20}FNO_4$  MW: 357.1 CAS No.: 122008-85-9

Fig. 1 Chemical structures of benfuresate and cyhalofop-butyl

## 2 実験方法

### 2.1 試料

2種類のWCRSを60℃以下で20時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、1mmのスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。

### 2.2 試薬

1) アセトン、酢酸エチル及びヘキサンは残留農薬・PCB試験用を用いた。メタノールは液体クロマトグラフ用及びギ酸は液体クロマトグラフ用（約99%、和光純薬工業製）を用いた。水はMilli-Q Advantage（Merck Millipore製）により精製した超純水（JIS K0211の5218に定義された超純水）を用いた。

#### 2) ベンフレセート標準原液

ベンフレセート標準品（純度99.8%、和光純薬工業製）25mgを正確に量って50mLの全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてベンフレセート標準原液を調製した（この液1mLは、ベンフレセートとして0.5mgを含有する。）。

#### 3) シハロホップブチル標準原液

シハロホップブチル標準品（純度99.7%、和光純薬工業製）25mgを正確に量って50mLの全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてシハロホップブチル標準原液を調製した（この液1mLは、シハロホップブチルとして0.5mgを含有する。）。

#### 4) 農薬混合標準原液

ベンフレセート標準原液及びシハロホップブチル標準原液各5mLを50mLの全量フラスコに正確に入れ、更に標線までアセトンを加えて、1mL中にベンフレセート及びシハロホップ

ブチルとしてそれぞれ 50  $\mu\text{g}$  を含有する農薬混合標準原液を調製した。

#### 5) 検量線作成用農薬混合標準液

使用に際して、農薬混合標準原液の一定量を、水-メタノール (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 ng を含有する各混合標準液を調製した。

### 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機 : SM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1430 rpm)
- 2) 振とう機 : レシプロシェーカー SR-2W タイテック製 (使用時振とう数 300 rpm)
- 3) 多孔性ケイソウ土カラム : InertSep K-solute (5 mL, 10 mL 及び 20 mL 保持用) ジーエルサイエンス製
- 4) グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (以下「積層ミニカラム」という。) : ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (500 mg/500 mg) Sigma-Aldrich 製
- 5) LC-MS/MS :  
LC 部 : Nexera X2 島津製作所製  
MS/MS 部 : LCMS-8040 島津製作所製

### 2.4 定量方法

#### 1) 抽出

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、水 20 mL を加え、30 分間静置後、更にアセトン 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液 5 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 0.5 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

#### 2) カラム処理 I

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム (5 mL 保持用) に入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 4 mL で洗浄し、洗液をカラムに加えた後、10 分間静置した。

200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して、ベンフレセート及びシハロホップブチルを溶出させた。更に、ヘキサン 90 mL をカラムに加え、同様に溶出させた。

溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。酢酸エチル 2 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

#### 3) カラム処理 II

積層ミニカラムを酢酸エチル 10 mL で洗浄した。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下 (自然流下させ、必要に応じて流速が 1 mL/min 程度になるよう吸引した。以下同様。) してベンフレセート及びシハロホップブチルを流出させた。試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。更に、酢酸エチル 4 mL をミニカラムに加え、同様に流出させた。

流出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後，窒素ガスを送って乾固した．水-メタノール (1+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし，5000×g で 5 分間遠心分離し，上澄み液を LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした．

4) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各検量線作成用農薬混合標準液各 10 μL を LC-MS/MS に注入し，選択反応検出 (以下「SRM」という．) クロマトグラムを得た．測定条件を Table 1 及び 2 に示した．

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 μm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% formic acid aqueous solution – 0.1 v/v% formic acid methanol solution (2:3) (hold for 1 min) → 12 min → (1:99) (hold for 20 min)
Flow rate	0.1 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	Air (4.4 L/min)
Drying gas	N <sub>2</sub> (20 L/min)
Interface temperature	350 °C
Heat block temperature	300 °C
Desolvation line temperature	300 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

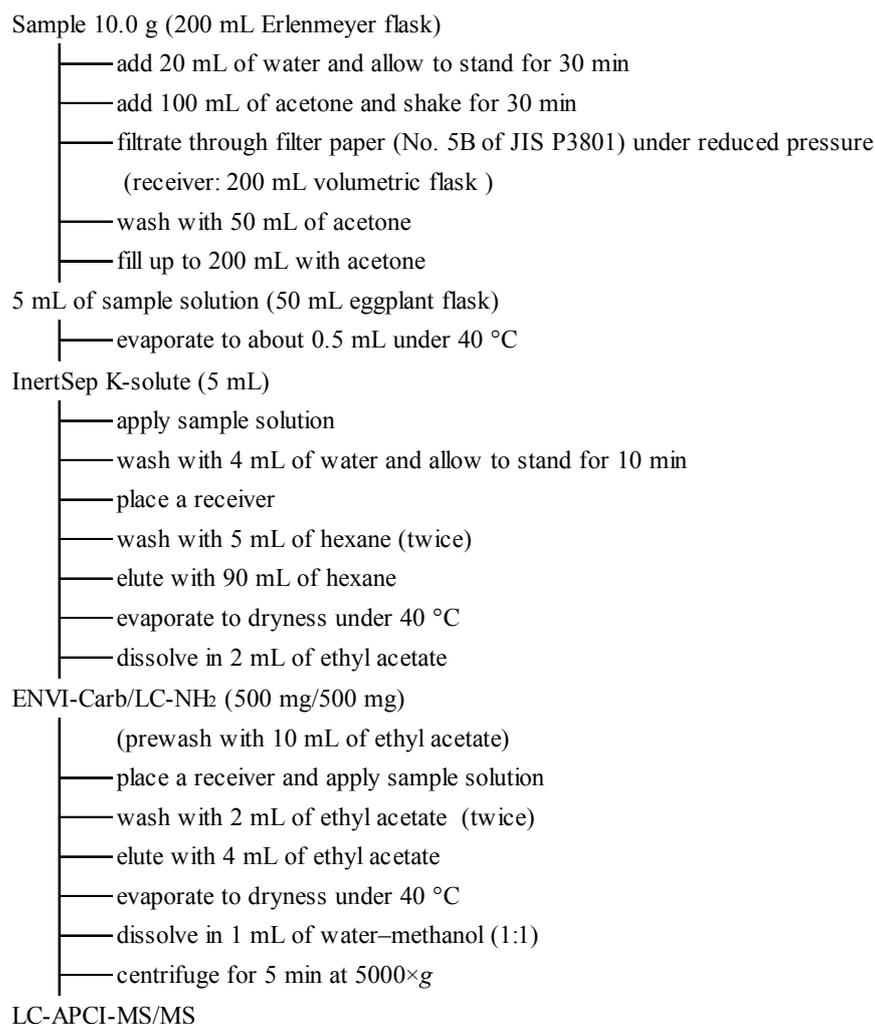
Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )	
Benfuresate	257	163	—	11
		—	121	22
Cyhalofop-butyl	358	256	—	11
		—	120	28

5) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し，試料中のベンフレセート量及びシハロホップブチル量を算出した．

なお，定量法の概要を Scheme 1 に示した．



Scheme 1 Analytical procedure for benfuresate and cyhalofop-butyl in whole-crop rice silage (WCRS)

## 2.5 抽出定容液の分取液量の検討方法

WCRS 10.0 g を 2.4 の 1) に従って抽出，ろ過及び定容した液 5, 10 及び 20 mL を 50 mL のなす形フラスコに，40 mL を 100 mL のなす形フラスコに分取した．これにそれぞれベンフレセートとして 0.4 mg/kg 相当量，シハロホップブチルとして 0.2 mg/kg 相当量を添加した後，40 °C 以下の水浴でそれぞれ約 0.5, 1, 2 及び 4 mL まで減圧濃縮し，分取液量 5 mL については保持容量が 5 mL，分取液量 10 mL については保持容量が 10 mL，分取液量 20 及び 40 mL については保持容量が 20 mL の多孔性ケイソウ土カラムに，試料溶液及び試料溶液の入っていたなす形フラスコを洗浄した水 4 mL を負荷した．分取液量 5 mL についてはヘキサン 100 mL で，分取液量 10, 20 及び 40 mL についてはそれぞれヘキサン 80 mL で各農薬を溶出させた．ヘキサンによる溶出後は 2.4 に従い定量し，回収率を求めた．なお，2.4 の 3) で得られた上澄み液の一部を水–メタノール (1+1) で，分取液量 10 mL については 2 倍，分取液量 20 mL については 4 倍，分取液量 40 mL については 8 倍に希釈して LC-MS/MS による測定を行った．

### 3 結果及び考察

#### 3.1 予備検討

GC-MS 法では、GC-MS による測定において夾雑物の影響を受け、ベンフレセート及びシハロホップブチルともに回収率が 120 %を上回った。夾雑物による影響の低減を試みたが、GC-MS では良好な結果が得られなかった。

ベンフレセート及びシハロホップブチルの LC-MS/MS による分析例として、岡本らが検討した、LC-MS/MS (エレクトロスプレーイオン化法 (以下「ESI」という。)) による餃子中の残留農薬一斉分析法<sup>7)</sup>がある。この方法を参考に精製方法を検討した結果、飼料分析基準の農薬一斉分析法でも使用されている積層ミニカラムによる精製が比較的良好な回収率が得られたが、シハロホップブチルの回収率は不十分であった。その要因として、イオン化阻害の影響が考えられたため、イオン化法をイオン化阻害の影響が比較的少ないとされる大気圧化学イオン化法 (以下「APCI」という。) に変更して測定した結果、両成分ともに比較的良好な回収率が得られた。予備検討の結果から、GC-MS 法を一部変更し、精製には積層ミニカラムを用い、LC-MS/MS (APCI) で測定する方法について以下詳細に検討をすることとした。

#### 3.2 LC-MS/MS (APCI) の測定条件

液体クロマトグラフ条件については、岡本らの方法に準じ、オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm) を用い、0.1 v/v%ギ酸溶液-0.1 v/v%ギ酸メタノール溶液のグラジェントの溶離液で測定したところ、測定液中のシハロホップブチルが流路に残留し、次の測定液のクロマトグラムに検出されることがあった。このため、最初の溶離液組成を 0.1 v/v%ギ酸メタノール溶液 55 %から 60 %に変更し、100 %での送液時間を 10 分から 15 分にしたところ、残留はなくなり、両成分とも良好なピークが得られた。また、流速を変えて標準液を測定した結果、0.1 mL/min とした場合に感度が最も良かった。

質量分析条件については、ベンフレセート標準原液及びシハロホップブチル標準原液の一定量をそれぞれ水-メタノール (1+1) で正確に希釈した各標準液から得られたマススペクトル (Fig. 2) 及びプロダクトイオンスペクトル (Fig. 3) からモニターイオン等を Table 2 のとおり定めた。

次にインターフェイス温度の条件を検討した。標準液を繰り返し測定した結果、シハロホップブチルのピーク強度のばらつきが大きく、この原因がインターフェイス温度にあると考えられた。このため、インターフェイス温度を変えて標準液を測定した結果、350 °C で最も繰り返し精度が良好であったため、インターフェイス温度は 350 °C とした。

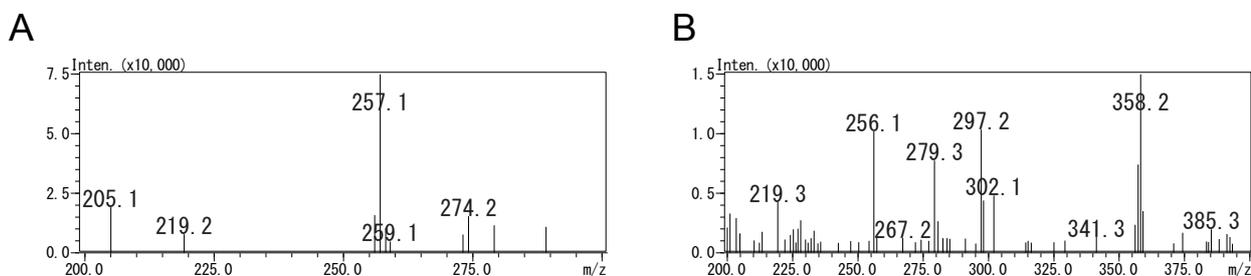


Fig. 2 Mass spectra of benfuresate (A) and cyhalofop-butyl (B)

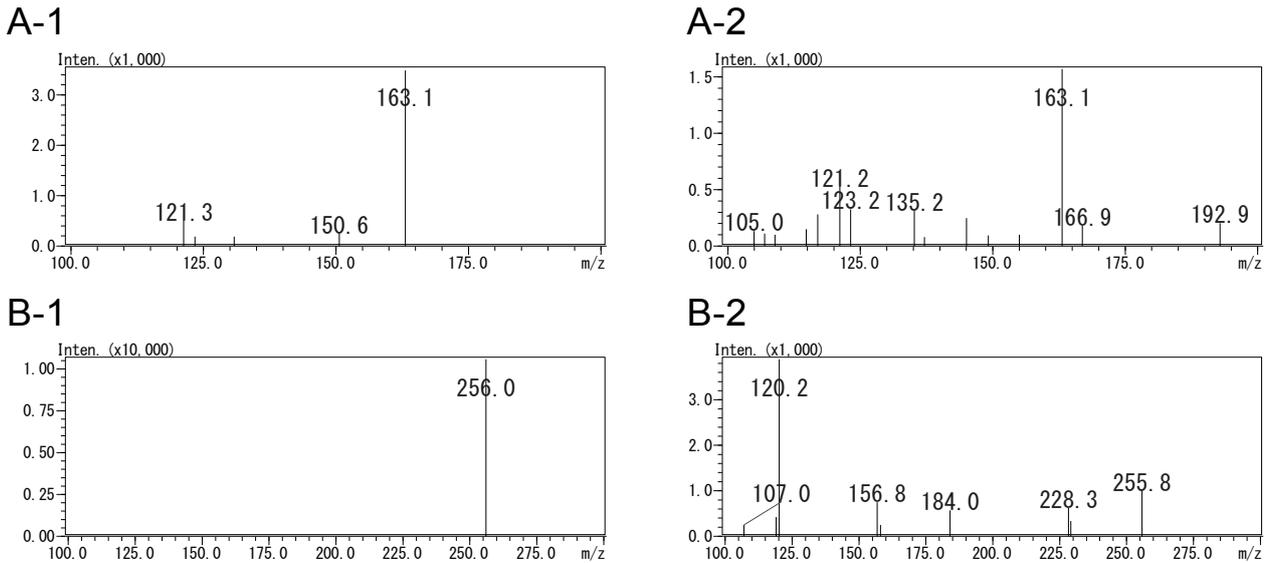


Fig. 3 Product ion spectra of benfuresate and cyhalofop-butyl

A-1: Benfuresate (precursor ion:  $m/z$  257, collision energy: 11 eV)

A-2: Benfuresate (precursor ion:  $m/z$  257, collision energy: 22 eV)

B-1: Cyhalofop-butyl (precursor ion:  $m/z$  358, collision energy: 11 eV)

B-2: Cyhalofop-butyl (precursor ion:  $m/z$  358, collision energy: 28 eV)

### 3.3 検量線

2.2 の 5)により調製した各検量線作成用農薬混合標準液各 10  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。得られた検量線の一例は、Fig. 4-1 及び Fig. 4-2 のとおりであり、各 1~200 ng/mL (注入量として 0.01~2 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、ベンフレセート及びシハロホップブチルを 0.004~0.8 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する。

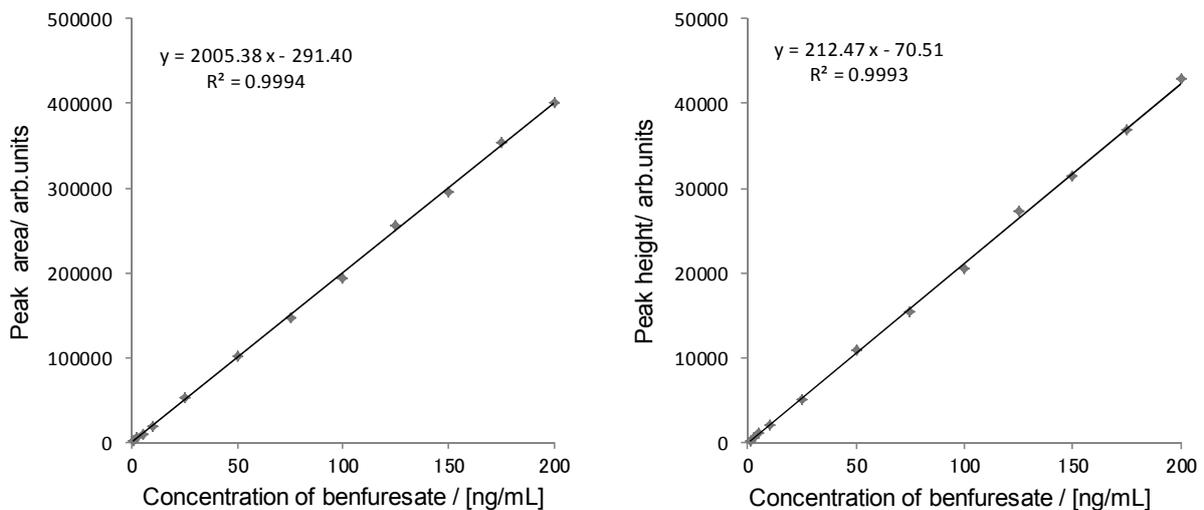


Fig. 4-1 Calibration curves of benfuresate by peak area (left) and peak height (right)

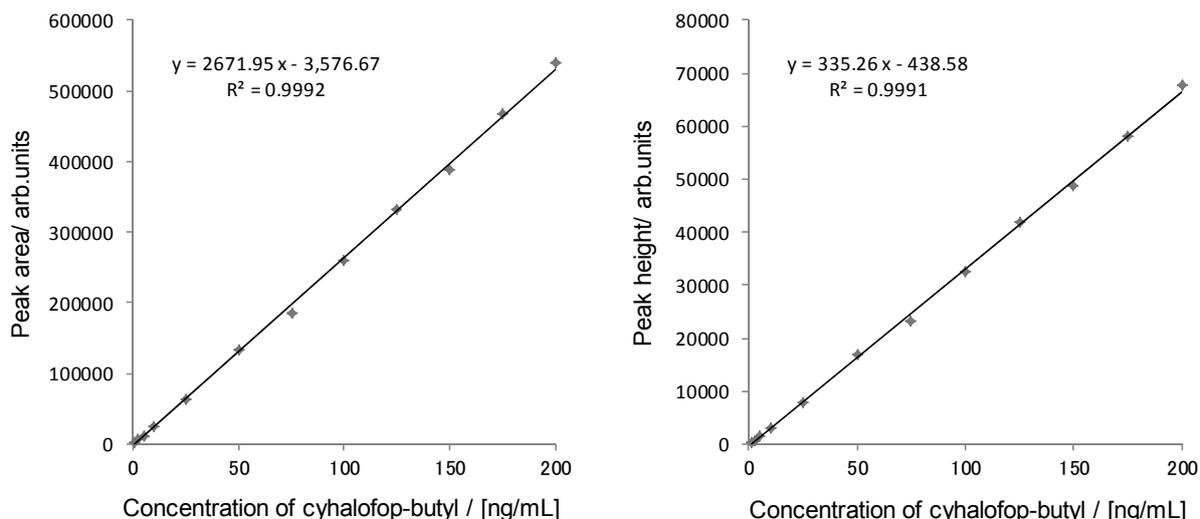


Fig. 4-2 Calibration curves of cyhalofop-butyl by peak area (left) and peak height (right)

### 3.4 抽出定容液の分取液量の検討

GC-MS 法では分析試料 10.0 g を本法 2.4 の 1) に従って抽出，ろ過及び定容した液 40 mL を分取し，保持容量が 20 mL の多孔性ケイソウ土カラムに供しているが，夾雑物低減を期待して，多孔性ケイソウ土カラムに供する抽出定容液の分取液量について，2.5 に従って検討を行った．その結果，得られた回収率は Table 3 のとおりであった．そこで，比較的回収率の良好な分取液量 5 mL 及び 10 mL の場合について，最終試料溶液における各農薬のマトリックス効果を確認したところ，分取液量 10 mL についてはイオン化促進が見られたため，抽出定容液の分取液量は 5 mL とした．

Table 3 Effects of volume of sample solution for purification on recoveries

Pesticides	Spiked level (mg/kg air-dry matter)	Recovery (%)			
		Volume of sample solution for purification			
		5 mL	10 mL	20 mL	40 mL
Benfuresate	0.4	95.8	116	120	116
Cyhalofop-butyl	0.2	98.3	106	86.3	44.6

n = 1

### 3.5 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分の確認

WCRS 10.0 g を本法 2.4 の 1) に従って抽出，ろ過及び定容し，得られた試料溶液 5 mL にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 0.4 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 50 及び 25 ng/mL 相当量）を添加し，多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分を確認した．その結果は Table 4 のとおりであり，ベンフレセート及びシハロホップブチルは，0~60 mL の画分に大部分が溶出し，シハロホップブチルについては 60~100 mL の画分においても溶出が認められたため，多孔性ケイソウ土カラムからのヘキサンでの溶出液量は 100 mL とした．

Table 4 Elution pattern of benfuresate and cyhalofop-butyl from InertSep K-solute

Pesticides	Recovery (%)				Total
	Hexane				
	0~60 mL	60~80 mL	80~100 mL	100~120 mL	
Benfuresate	90	0	0	0	90
Cyhalofop-butyl	90	2	1	0	93

$n = 1$

### 3.6 積層ミニカラムからの流出画分の確認

WCRS 10.0 g を 2.4 の 1) 及び 2) に従って調製し、得られた溶出液にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 0.4 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 100 及び 50 ng/mL 相当量）を添加し、積層ミニカラムからの流出画分を確認した。その結果は Table 5 のとおりであり、いずれの農薬も 0~10 mL の画分に流出し、その他の画分には流出は認められなかった。このことから、酢酸エチル 10 mL で流出させることとした。

Table 5 Elution pattern of benfuresate and cyhalofop-butyl from ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub>

Pesticides	Recovery (%)			Total
	Ethyl acetate			
	0~10 mL	10~12 mL	12~14 mL	
Benfuresate	99	0	0	99
Cyhalofop-butyl	100	0	0	100

$n = 1$

### 3.7 妨害物質の検討

WCRS 2 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においてもベンフレセート及びシハロホップブチルの定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SRM クロマトグラムを Fig. 5 に示した。

### 3.8 マトリックス効果の確認

2.4 の 1) から 3) により調製した WCRS のブランク試料溶液にベンフレセートとして 0.02 及び 0.4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 100 ng/mL 相当量）、シハロホップブチルとして 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 50 ng/mL 相当量）をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について、2.2 の 5) に従って調製した同濃度の各農薬標準液に対するピーク面積比を確認したところ、Table 6 のとおりであり、各農薬は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

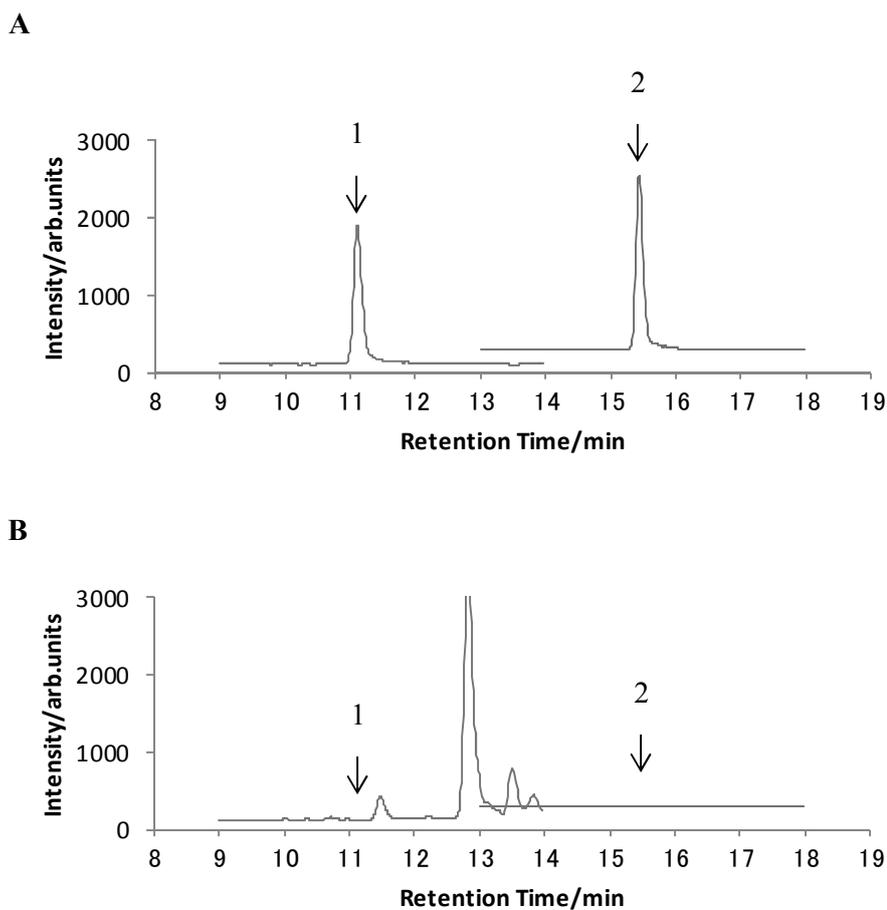


Fig. 5 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of standard and blank sample solution

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of 1: benfuresate and 2: cyhalofop-butyl. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (5 ng/mL: 50 pg as each pesticide)

B: Sample solution of WCRS (blank)

Table 6 Results of matrix effect study

Pesticides	Concentration of pesticides		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample <sup>a)</sup> (mg/kg air-dry matter)	
Benfuresate	5	0.02	100
	100	0.4	100
Cyhalofop-butyl	5	0.02	112
	50	0.2	107

$n = 1$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of pesticides in the presence of matrix to that in the absence of matrix

### 3.9 添加回収試験

2.2の2)~4)のベンフレセート標準原液及びシハロホップブチル標準原液をアセトンで正確に希

釈し添加に用いた。

WCRS について、ベンフレセートとして、原物換算して 0.009 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 100 ng/mL），シハロホップブチルとして、原物換算して 0.009 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 50 ng/mL）になるようにそれぞれ添加してよく混合し、一夜静置した後に本法に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、添加は風乾物試料に対してベンフレセートとして 0.02 及び 0.4 mg/kg 相当量、シハロホップブチルとして 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して、原物（水分含有量 60 %）中濃度 = 風乾物（水分含有量 10 %）中濃度 / 2.25 の式により行った。

その結果は Table 7 のとおり、ベンフレセートの平均回収率は 86.0~101 %， $RSD_r$  は、12 % 以下、シハロホップブチルの平均回収率は 85.3~93.2 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 14 % 以下の成績が得られ、飼料分析基準の妥当性確認法ガイドライン<sup>5)</sup>（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たしていた。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 6 に示した。

Table 7 Recoveries for benfuresate and cyhalofop-butyl

Pesticides	Spiked level (mg/kg original matter) <sup>a)</sup>	Sample			
		WCRS 1		WCRS 2	
		Recovery <sup>b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)
Benfuresate	0.009	86.0	6.4	91.1	12
	0.2	89.2	11	101	2.7
Cyhalofop-butyl	0.009	93.2	7.7	85.3	14
	0.1	87.0	11	91.0	5.4

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

c) The pesticides were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.02 and 0.4 mg/kg air-dry matter for benfuresate and 0.02 and 0.2 mg/kg air-dry matter for cyhalofop-butyl, respectively. The levels of pesticides in original matter were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

The levels of pesticides in original matter (moisture 60 %)

= the levels of pesticides in air-dry matter (moisture 10 %) / 2.25

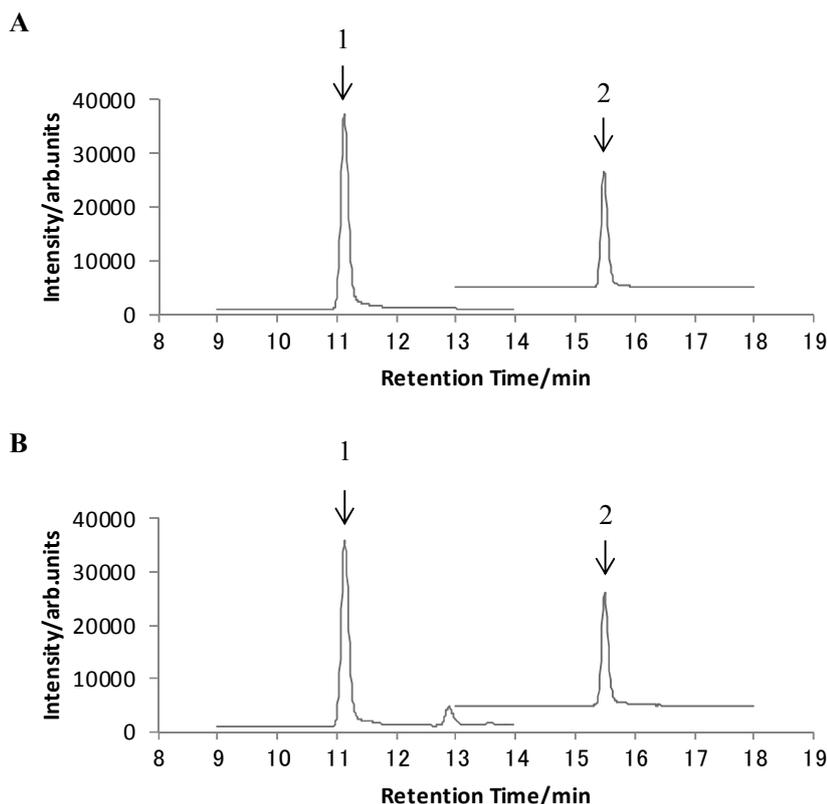


Fig. 6 SRM chromatograms on recovery test

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peaks of 1: benfuresate and 2: cyhalofop-butyl. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (100 ng/mL: 1 ng as benfuresate and 50 ng/mL: 0.5 ng as cyhalofop-butyl)

B: Sample solution of WCRS (spiked at 0.2 mg/kg original matter of benfuresate (as 100 ng/mL in sample solution), and 0.1 mg/kg original matter of cyhalofop-butyl (as 50 ng/mL in sample solution))

### 3.10 定量下限及び検出下限

ベンフレセート及びシハロホップブチル検量線が直線性を示した範囲，各 1~200 ng/mL の下端付近となる濃度（WCRS 風乾物中で 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量））の添加回収試験の結果，得られたピークの SN 比が 10 以上であったため，ベンフレセート及びシハロホップブチルの定量下限の濃度は WCRS の風乾物中で 0.02 mg/kg とした．この濃度は，ベンフレセート及びシハロホップブチルの WCRS 中の管理基準値の風乾物中換算値（それぞれ 0.45 及び 0.225 mg/kg）に対してそれぞれ 1/22 及び 1/11 であり，妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた．

本法の検出下限を確認するため，添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた．その結果，検出下限は風乾物中でベンフレセートは 0.006 mg/kg，シハロホップブチルは 0.0005 mg/kg であり，同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた．

なお，Table 7 に示したとおり，当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった．

### 3.11 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため，濃度非通知，かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共

同試験を実施した。

共通試料としては、WCRS 1（風乾物）にベンフレセートとして 0.45 mg/kg 相当量及びシハロホップブチルとして 0.225 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にベンフレセート 4.5 µg 及びシハロホップブチル 2.25 µg を含有する混合標準液 1 mL）を、WCRS 2（風乾物）にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 0.045 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にベンフレセート及びシハロホップブチル各 0.45 µg を含有する混合標準液 1 mL）を、それぞれ各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた。

参加試験室は、一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所、一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所、一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター、フィード・ワン株式会社研究所、株式会社島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センター（計 11 試験室）であった。結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>8), 9)</sup>を参考に、Cochran 検定、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行い、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度 ( $RSD_f$ ) 及び室間再現精度 ( $RSD_R$ ) を算出し、得られた  $RSD_R$  から、修正 Horwitz 式<sup>10)</sup>を用いて HorRat を求めた。

ベンフレセートの結果は Table 8 のとおりであり、WCRS 1 及び WCRS 2 について、平均回収率は 96.1 及び 94.7 %、 $RSD_f$  は 2.6 及び 3.7 %、 $RSD_R$  は 8.1 及び 10 %、HorRat は 0.45 及び 0.45 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たしていた。HorRat が 0.5 をわずかに下回ったが、分析操作が比較的簡便であるためと考えられた。

シハロホップブチルの結果は Table 9 のとおりであり、WCRS 1 及び WCRS 2 について、平均回収率は 92.7 及び 97.0 %、 $RSD_f$  は 2.7 及び 4.8 %、 $RSD_R$  は 22 及び 32 %、HorRat は 1.1 及び 1.5 であり、試験法の妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たしていた。シハロホップブチルの  $RSD_R$  は、ベンフレセートに比べ大きい傾向が認められたが、一部の試験室からシハロホップブチルの感度が安定しないとの報告があったことから、LC-MS/MS 機体のコンディションによる影響を受けているものと考えられた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 10 に示した。

Table 8 Collaborative study for benfuresate

Lab. No.	Sample			
	WCRS 1		WCRS 2	
	(mg/kg air-dry matter)		(mg/kg air-dry matter)	
1	0.426	0.420	0.0435	0.0407
2	0.398	0.397	0.0386	0.0394
3	0.459	0.437	0.0466	0.0512
4	0.444	0.408	0.0470	0.0456
5	0.403	0.390	0.0394	0.0375
6	0.480	0.483	0.0370	0.0379
7	0.442	0.445	0.0413	0.0409
8	0.485	0.509	0.0475	0.0482
9	0.383	0.394	0.0402	0.0375
10	0.444	0.435	0.0468	0.0458
11	0.420	0.415	0.0440	0.0409
Spiked level (mg/kg air-dry matter)	0.45		0.045	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg air-dry matter)	0.433		0.0426	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	96.1		94.7	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	2.6		3.7	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	8.1		10	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	18		22	
HorRat	0.45		0.45	

a)  $n = 22$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 9 Collaborative study for cyhalofop-butyl

Lab. No.	Sample			
	WCRS 1		WCRS 2	
	(mg/kg air-dry matter)		(mg/kg air-dry matter)	
1	0.213	0.212	0.0444	0.0383
2	0.179	0.175	0.0337	0.0332
3	0.193	0.181	0.0324	0.0327
4	0.324	0.314	0.0708	0.0688
5	0.211	0.212	0.0561	0.0586
6	0.184	0.180	0.0368	0.0386
7	0.251	0.246	0.0643	0.0644
8	0.217	0.210	0.0399	0.0388
9	0.128	0.143	0.0260	0.0261
10	0.199	0.210	0.0399	0.0333
11	0.206	0.201	0.0419	0.0409
Spiked level (mg/kg air-dry matter)	0.225		0.045	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg air-dry matter)	0.209		0.0436	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	92.7		97.0	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	2.7		4.8	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	22		32	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	20		22	
HorRat	1.1		1.5	

a)  $n = 22$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 10 Instruments used in the collaborative study

Lab.No	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
2	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
3	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Mightysil RP-18GP
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
7	LC: Nexera XR, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: QTRAP 5500 AB SCIEX	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
8	LC: Alliance 2695, Waters	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
9	LC: Prominence Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: QTRAP 5500 AB SCIEX	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
10	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-3 HP, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
11	LC: 1200 Series Agilent Technologies	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: 6410 Triple Quadrupole LC/MS Agilent Technologies	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)

#### 4 まとめ

WCRS に残留するベンフレセート及びシハロホップブチルについて、GC-MS 法を基に、LC-MS/MS を用いた同時定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、抽出定容液の分取液量の変更、多孔性ケイソウ土カラムの保持容量の変更、ゲル浸透クロマトグラフ及びエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を積層ミニカラムによる精製に変更並びに GC-MS による測定から LC-MS/MS (APCI) による測定に変更することで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線はそれぞれ 1~200 ng/mL (注入量として 0.01~2 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。  
 なお、当該検量線の濃度範囲は、ベンフレセート及びシハロホップブチルを 0.004~0.8 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する。
- 2) WCRS について、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。

- 3) 本法に従い得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、ベンフレセート及びシハロホップブチルは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 4) 原物中に換算してベンフレセートとして 0.009 及び 0.2 mg/kg 相当量、シハロホップブチルとして 0.009 及び 0.1 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 5) 本法のベンフレセートの定量下限は風乾物中で 0.02 mg/kg、検出下限は 0.006 mg/kg、シハロホップブチルの定量下限は風乾物中で 0.02 mg/kg、検出下限は 0.0005 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた。
- 6) WCRS 1 (風乾物) にベンフレセートとして 0.45 mg/kg 相当量及びシハロホップブチルとして 0.225 mg/kg 相当量を、WCRS 2 (風乾物) にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 0.045 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 11 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。

## 謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所，一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所，一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター，フィード・ワン株式会社研究所及び株式会社島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センターにおける関係者各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 環境省中央環境審議会土壤農薬部会農薬小委員会（第 23 回）：水質汚濁に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料，平成 22 年 11 月 19 日 (2010).
- 2) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 3) 環境省中央環境審議会土壤農薬部会農薬小委員会（第 38 回）：水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準として環境大臣が定める基準の設定に関する資料，平成 26 年 1 月 21 日 (2014).
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2010).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 6) 佐藤 梢，風間 鈴子：稲わら及び粳米中のベンフレセート及びシハロホップブチルのガスクロマトグラフ質量分析計による同時定量法，飼料研究報告，38，108-125 (2013).
- 7) 岡本 葉，高取 聡，北川 陽子，起橋 雅浩，福井 直樹，村田 弘，住本 建夫，田中 之雄，尾花 裕孝：LC-MS/MS による餃子中の農薬一斉分析法の検討，食品衛生学雑誌，50，10-15 (2009).

- 8) William Horwitz: Protocol for design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 9) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 10) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

**技術レポート****1 飼料中のカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブの液体クロマトグラフトンデム型質量分析計による同時定量法の開発**田中 里美<sup>\*</sup>, 桑原 正良<sup>\*</sup>**Development of Simultaneous Determination Method  
of Carbaryl, Carbofuran and Fenobucarb in Feed by LC-MS/MS**Satomi TANAKA<sup>\*</sup> and Masayoshi KUWABARA<sup>\*</sup>

(\* Kobe Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

An analytical method was developed to determine the levels of carbaryl, carbofuran and fenobucarb in feed using a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to the sample, carbaryl, carbofuran and fenobucarb were extracted with acetone and the extracted solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a volume of 200 mL. The sample solution was purified with a SPE column (InertSep Slim-J C18-B, GL sciences Inc.; Tokyo, Japan) and injected into the LC-MS/MS to determine the levels of carbaryl, carbofuran and fenobucarb. LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) using a gradient with 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on formula feed for finishing beef cattle, wheat, corn, milo and oaten hay. Formula feed for finishing beef cattle and corn were spiked with 0.01 or 0.1 mg/kg of carbaryl, 0.01 or 0.05 mg/kg of carbofuran and 0.01 or 0.3 mg/kg of fenobucarb. Wheat was spiked with 0.01 or 2 mg/kg of carbaryl, 0.01 or 0.2 mg/kg of carbofuran and 0.01 or 0.3 mg/kg of fenobucarb. Milo was spiked with 0.01 or 10 mg/kg of carbaryl, 0.01 or 0.1 mg/kg of carbofuran and 0.01 or 0.3 mg/kg of fenobucarb. Oaten hay was spiked with 0.1 or 250 mg/kg of carbaryl, 0.1 or 13 mg/kg of carbofuran and 0.1 or 10 mg/kg of fenobucarb. The mean recoveries ranged from 86.6 to 103 % for carbaryl, 91.3 to 105 % for carbofuran and 85.5 to 99.1 % for fenobucarb. The relative standard deviations of repeatability (RSD<sub>r</sub>) were not more than 10 % for carbaryl, 7.4 % for carbofuran and 11 % for fenobucarb.

Key words: carbaryl; carbofuran; fenobucarb; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed

キーワード：カルバリル；カルボフラン；フェノブカルブ；液体クロマトグラフトンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料

**1 緒 言**

カルバリルは、米国 Union Carbide 社が開発したカーバメート系の殺虫剤であり、我が国では1959年に国内登録されている<sup>1)</sup>。カルボフランは米国 FMC 社が導入したカーバメート系の殺虫剤

<sup>\*</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

であり、国内登録はされておらず、米国でも使用が中止されている<sup>2)</sup>。フェノブカルブはクミアイ化学が開発したカーバメート系の殺虫剤であり、1968年に国内登録されている<sup>1), 3)</sup>。

これらの農薬の我が国における飼料中の残留基準としては、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令<sup>4)</sup>において、カルバリルはえん麦及びマイロで 10 mg/kg、大麦及びライ麦で 5 mg/kg、小麦で 2 mg/kg、とうもろこしで 0.1 mg/kg 及び牧草で 250 mg/kg、カルボフランは、カルボフラン及び 3-OH カルボフランをカルボフラン含量に換算したものの和と規定され<sup>5)</sup>、えん麦、マイロ及びライ麦で 0.1 mg/kg、大麦及び小麦で 0.2 mg/kg、とうもろこしで 0.05 mg/kg 及び牧草で 13 mg/kg、フェノブカルブはえん麦、大麦、小麦、とうもろこし、マイロ及びライ麦ともに 0.3 mg/kg の基準値が設定されている。また、フェノブカルブは、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準<sup>6)</sup>において飼料用イネ（稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米）の管理基準値が設定されている。

飼料（飼料用イネを除く。）中の当該 3 成分を含むカーバメート系農薬の同時定量法としては、飼料分析基準<sup>7)</sup>にポストカラム蛍光誘導体化液体クロマトグラフで定量する分析法が収載されている。しかし、この方法は上記基準値を念頭に置いた妥当性確認が実施されていない。また、測定機器についても、より汎用性のあるものが望ましい。

榑原は、財団法人日本食品分析センターが平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業において開発した LC-MS/MS を用いた定量法<sup>8)</sup>（以下「JFRL 法」という。）を基に、飼料用イネ中の当該 3 成分を含む 8 成分の同時定量法について飼料分析基準への適用の可否を検討し、稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米に適用可能な定量法<sup>9)</sup>（以下「イネ法」という。）を確立した。今回、飼料（飼料用イネを除く。）中のカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブについて、JFRL 法及びイネ法を基に飼料分析基準への収載を目途とした同時定量法の開発等について検討したので、その概要を報告する。

参考にカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブの構造式等を Fig. 1 に示した。

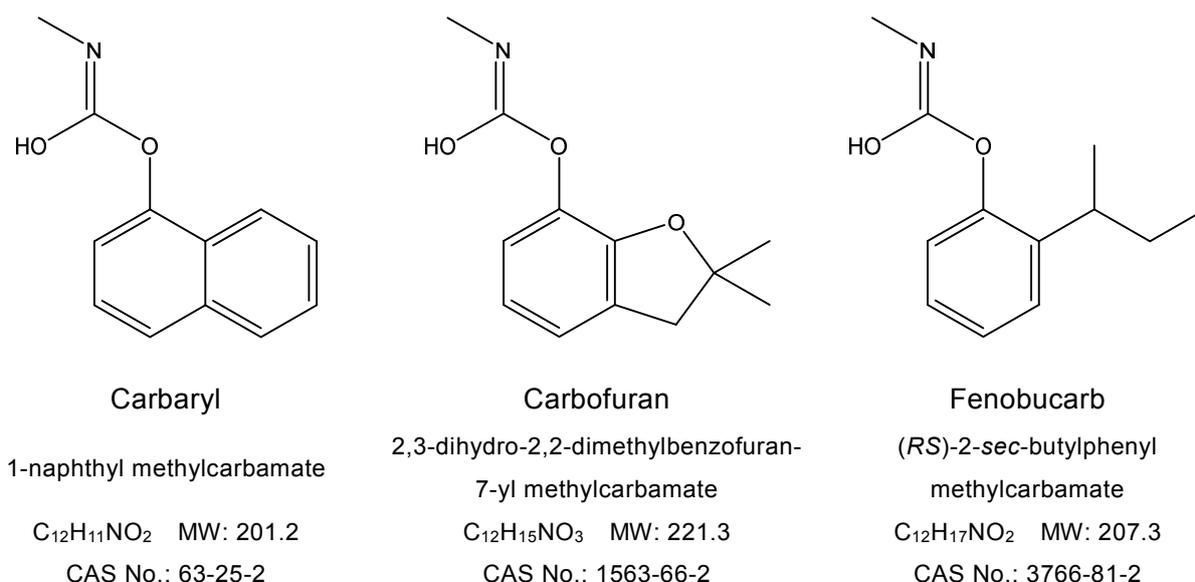


Fig. 1 Chemical structures of carbaryl, carbofuran and fenobucarb

## 2 実験方法

### 2.1 試料

成鶏飼育用配合飼料，種豚飼育用配合飼料，肉用牛肥育用配合飼料，えん麦，大麦，小麦，とうもろこし，マイロ，ライ麦，アルファルファ乾草及びオーツ乾草はそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。なお，検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For breeding period chicken	Grains	55	Corn, brown rice, milo
	Oil seed meal	26	Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal, sesame meal, corn germ meal
	Animal by-products	1	Meat-and-bone meal
	Brans	2	Rice bran, corn gluten feed
	Others	16	Calcium carbonate, animal fat, dried leftover, corn steep liquor, calcium phosphate, salt, enzyme-treated copra meal, feed additives
For breeding period pigs	Grains	65	Corn, milo, oat
	Oil seed meal	13	Soybean meal
	Animal by-products	3	Fish meal
	Brans	8	Wheat bran, rice powder
	Others	11	Alfalfa meal, bakery waste, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, feed additives
For finishing beef cattle	Grains	56	Barley, corn, corn starch, potato starch
	Oil seed meal	5	Soybean meal
	Brans	38	Wheat bran, hominy feed, soybean hulls, corn gluten feed, rice bran, brewers grains
	Others	1	Molasses, calcium carbonate, salt, lactic acid bacteria, brewers yeast, butyric acid bacteria, saccharification bacteria, natural aluminum silicate, light silicic acid, galacto-oligosaccharide, glucose, zeolite, calcium propionate

### 2.2 試薬

1) アセトンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。アセトニトリルはカラム処理には残留農薬・PCB 試験用を用い，標準液及び LC-MS/MS 溶離液には液体クロマトグラフ用を用いた。酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用（1 mol/L 溶液，和光純薬工業製）を用いた。水は Millipore, DIRECT-Q UV 3（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

#### 2) カルバリル標準原液

カルバリル標準品（純度 99.8%，関東化学製）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線までアセトンを加えてカルバリル標準原液を調製した（この液 1 mL は，カルバリルとして 0.5 mg を含有する。）。

#### 3) カルボフラン標準原液

カルボフラン標準品（純度 99.8%，関東化学製）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線までアセトンを加えてカルボフラン標準原液を調製した（この液 1 mL は，カルボフランとして 0.5 mg を含有する。）。

## 4) フェノブカルブ標準原液

フェノブカルブ標準品（純度 98.4%，関東化学製）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線までアセトンを加えてフェノブカルブ標準原液を調製した（この液 1 mL は，フェノブカルブとして 0.5 mg を含有する．）．

## 5) 混合標準液

各標準原液各 2 mL を 100 mL の全量フラスコに入れて混合し，更に標線までアセトンを加えて混合標準原液を調製した（この液 1 mL は，カルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブとして各 10 µg を含有する．）．

使用に際して，混合標準原液の一定量を，アセトニトリル-水（3+2）で正確に希釈し，1 mL 中にカルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブとして各 0.04，0.06，0.08，0.1，0.2，0.4，0.6，0.8，1，2，4，6，8，10，20，40，60，80，100，200，400 及び 600 ng を含有する混合標準液を調製した．

## 2.3 装置及び器具

## 1) 粉砕機：

粉砕機 1（乾牧草以外用）：ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）

粉砕機 2（乾牧草用）：SM 2000 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数（仕様）835 rpm）

## 2) 振とう機：MW-DRV 宮本理研工業製（使用時振とう数 300 rpm）

3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep Slim-J C18-B（充てん剤量 500 mg）  
ジューエルサイエンス製にリザーバーを連結したもの

## 4) LC-MS/MS：

LC 部：ACQUITY UPLC System Waters 製

MS/MS 部：ACQUITY TQ Detector Waters 製

## 2.4 定量方法

## 1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ，水 20 mL（乾牧草は 30 mL）を加え，30 分間静置後，更にアセトン 100 mL（乾牧草は 120 mL）を加え，30 分間振り混ぜて抽出した．200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き，抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後，先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 50 mL で洗浄し，同様に吸引ろ過した．更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた．この液 2 mL（乾牧草については，この液の一定量をアセトンで正確に 10 倍希釈した液 2 mL）を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ，水 20 mL を加えて，カラム処理に供する試料溶液とした．

## 2) カラム処理

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄した．試料溶液をミニカラムに入れ，流速 1 mL/min 程度で吸引して液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた．更に試料溶液の入っていたなす形フラスコを水-アセトニトリル（9+1）5 mL ずつで 2 回洗浄し，洗液を順次ミニカラムに加え，同様に流出させた．10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き，アセトニトリル-水（3+2）9 mL をミニカラムに加え，同様に吸引して各農薬成分を溶出させた．全量フラスコの標線まで同溶媒を加え，この液の一定量を 5000×g で 5 分間遠心分離し，上澄み液を LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とし

た.

### 3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各混合標準液各 5  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出（以下「SRM」という。）クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 $\mu\text{m}$ ), Agilent Technologies
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate solution–acetonitrile (4:1) → 15 min → (1:9) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}\text{C}$
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	120 $^{\circ}\text{C}$
Desolvation gas	$\text{N}_2$ (650 L/h, 350 $^{\circ}\text{C}$ )
Capillary voltage	1 kV
Cone gas	$\text{N}_2$ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.20 mL/h)

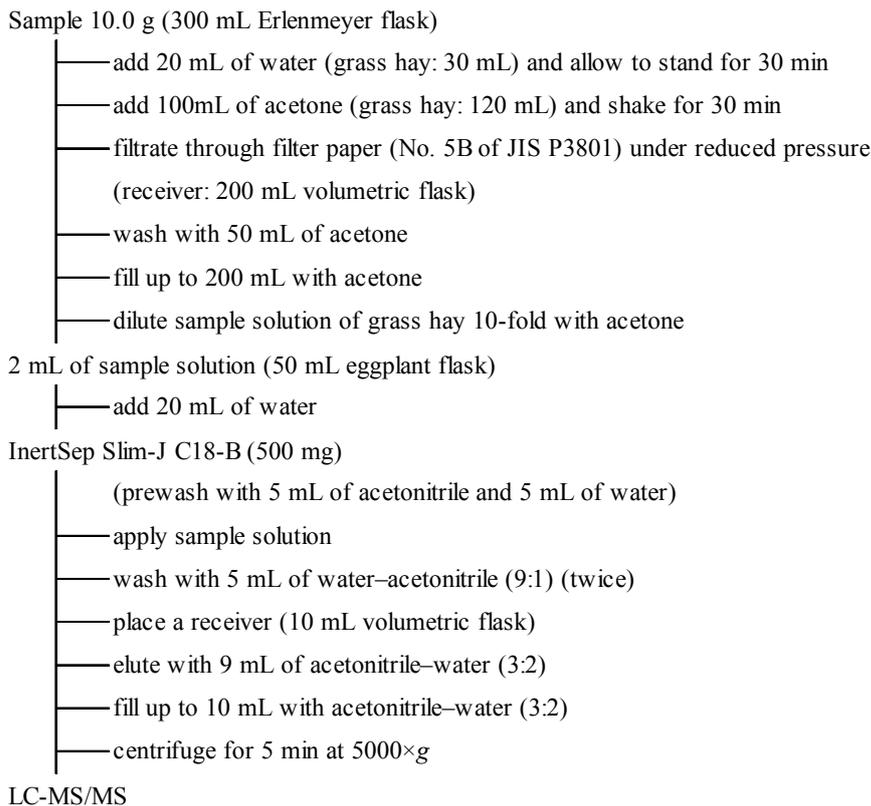
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( $m/z$ )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier ( $m/z$ )	Qualifier ( $m/z$ )		
Carbaryl	202	145	—	22	12
		—	127	22	28
Carbofuran	222	165	—	24	12
		—	123	24	23
Fenobucarb	208	95	—	24	16
		—	77	24	36

### 4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中のカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブ量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for carbaryl, carbofuran and fenobucarb in feed

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

2.2 の 5) に従って調製した各混合標準液各 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し，得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した．得られた検量線の一例は，Fig. 2-1 から 2-3 のとおりであり，カルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブは各 0.04~600 ng/mL (注入量として 0.0002~3 ng) の範囲で直線性を示した．

なお，当該検量線の濃度範囲は，カルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブを 0.004~60 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中のカルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブ濃度範囲に相当する．

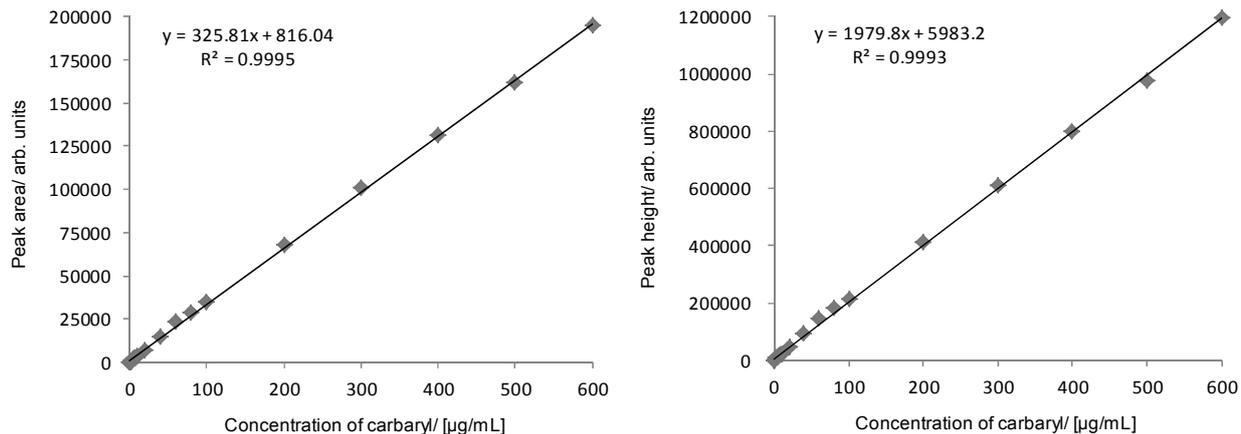


Fig. 2-1 Calibration curves of carbaryl by peak area (left) and peak height (right)

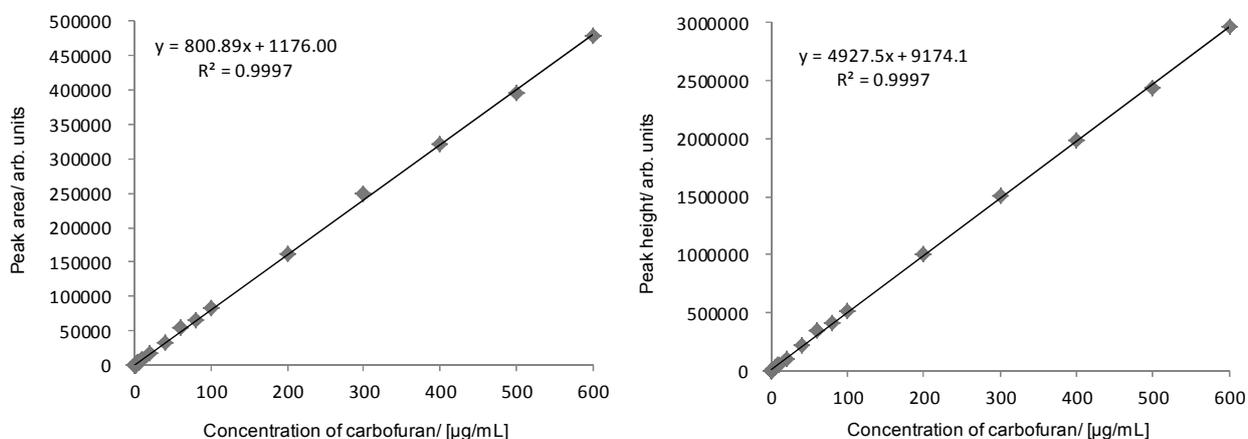


Fig. 2-2 Calibration curves of carbofuran by peak area (left) and peak height (right)

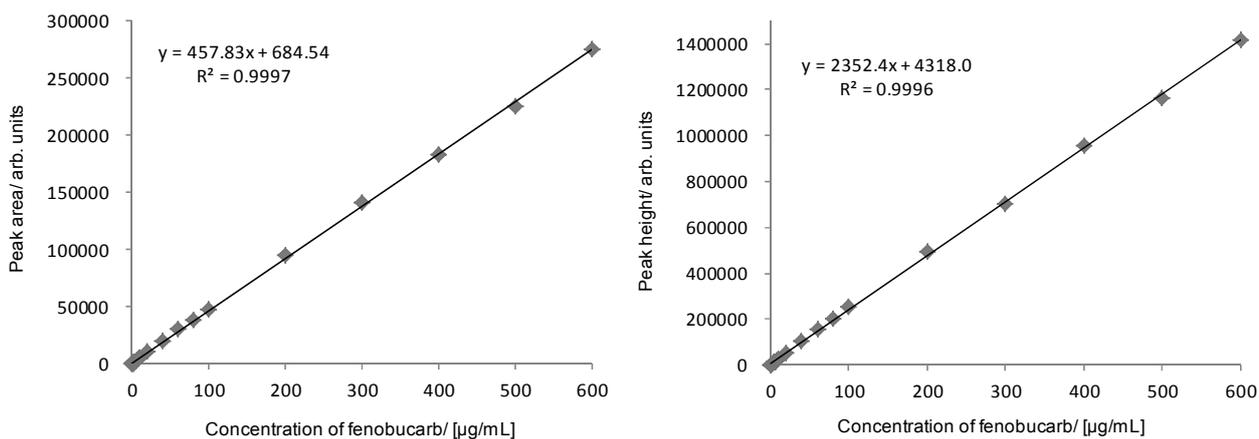


Fig. 2-3 Calibration curves of fenobucarb by peak area (left) and peak height (right)

### 3.2 抽出後の希釈操作について

飼料中のカルバリル等について最も低い基準値は、カルボフランのとうもろこしで 0.05 mg/kg と定められている。イネ法は、アセトン抽出後 200 mL に定容し、更に 10 倍希釈（稲発酵粗飼料は 100 倍希釈）を行うが、定量下限が 0.1 mg/kg であることから、飼料に適用するためにはよ

り低い濃度まで定量下限を下げる必要がある。そのため，基準値が高い乾牧草以外については，抽出後の 10 倍希釈を行わないこととして以後の検討を行った。

### 3.3 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分の確認

小麦を用い，2.4 の 1)により調製したカラム処理に供する試料溶液に，カルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブとして 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量）を添加し，オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果は Table 4 のとおりであり，カルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブはアセトニトリル-水（3+2）0~9 mL の画分に溶出し，9~18 mL の画分には溶出が見られなかった。JFRL 法<sup>8)</sup>では 10 mL で溶出させているが，溶出液を受ける容器が 10 mL 全量フラスコであり標線を超えるおそれがあることから，本法では，9 mL で溶出させた後，全量フラスコの標線まで同溶媒を加え LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

Table 4 Elution pattern of pesticides from InertSep Slim-J C18-B

Pesticides	Mean recovery (%)			Total
	Water-acetonitrile	Acetonitrile-water	Acetonitrile-water	
	(9:1)	(3:2)	(3:2)	
	10 mL	0~9 mL	9~18 mL	
Carbaryl	0	97.0	0	97.0
Carbofuran	0	96.6	0	96.6
Fenobucarb	0	97.8	0	97.8

$n = 3$

### 3.4 妨害物質の検討

成鶏飼育用配合飼料，種豚飼育用配合飼料，肉用牛肥育用配合飼料，えん麦，大麦，小麦，とうもろこし，マイロ，ライ麦，アルファルファ乾草及びオーツ乾草各 1 検体を試料として，2.4 の 1)及び 2)により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し，得られた SRM クロマトグラムを確認したところ，いずれの試料においてもカルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブの定量を妨げるピークは認められなかった。

なお，当該試料の SRM クロマトグラムを Fig. 3 に示した。

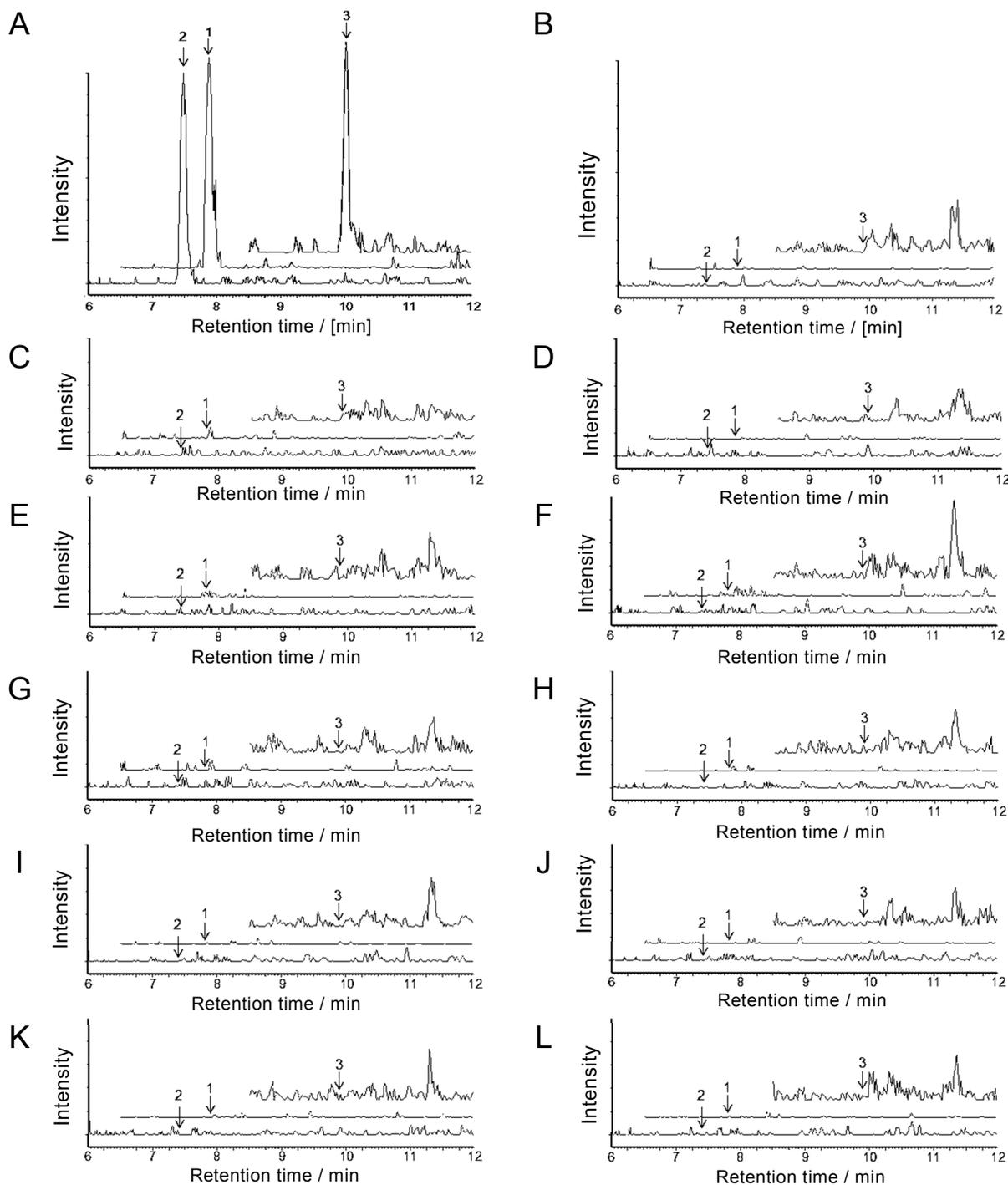


Fig. 3 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of standard solution and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention time of 1: carbaryl, 2: carbofuran and 3: fenobucarb. The scale of vertical axis is normalized to chromatogram A, in which the peak height of the 0.1 ng/mL standard solution is to be shown as 100 % in each segment. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (The concentration is each 0.1 ng/mL as carbaryl, carbofuran and fenobucarb.)

B~L: Blank sample solution (B: formula feed for breeding period chicken, C: formula feed for breeding period pigs, D: formula feed for finishing beef cattle, E: oat, F: barley, G: wheat, H: corn, I: milo, J: rye, K: alfalfa hay, L: oaten hay)

### 3.5 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)及び 2)により調製した成鶏飼育用配合飼料，種豚飼育用配合飼料，肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしのブランク試料溶液にカルバリルとして 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量），カルボフラン及びフェノブカルブとして 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量）を，えん麦，大麦，小麦，マイロ及びライ麦のブランク試料溶液にカルバリルとして 2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 20 ng/mL 相当量），カルボフラン及びフェノブカルブとして 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量）を，アルファルファ乾草及びオーツ乾草のブランク試料溶液にカルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブとして 20 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 20 ng/mL 相当量）をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について，2.2 の 5)に従って調製した同濃度の混合標準液に対するピーク面積比を確認したところ，ピーク面積比は Table 5 のとおり，カルバリルで 93~108 %，カルボフランで 97~109 %，フェノブカルブで 93~104 %であり，カルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

Table 5 Results of matrix effect study

Feed types of matrix	Carbaryl			Carbofuran			Fenobucarb		
	Concentration		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)	Concentration		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)	Concentration		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)
	in matrix standard solution (µg/mL)	in sample <sup>a)</sup> (mg/kg)		in matrix standard solution (µg/mL)	in sample <sup>a)</sup> (mg/kg)		in matrix standard solution (µg/mL)	in sample <sup>a)</sup> (mg/kg)	
Formula feed for									
breeding period chicken	10	1	96	5	0.5	98	5	0.5	93
breeding period pigs	10	1	96	5	0.5	99	5	0.5	96
finishing beef cattle	10	1	108	5	0.5	103	5	0.5	104
Oat	20	2	93	10	1	97	10	1	99
Barley	20	2	104	10	1	106	10	1	97
Wheat	20	2	106	10	1	109	10	1	104
Corn	10	1	97	5	0.5	101	5	0.5	94
Milo	20	2	98	10	1	101	10	1	93
Rye	20	2	104	10	1	103	10	1	100
Alfalfa hay	20	20	108	20	20	101	20	20	97
Oaten hay	20	20	102	20	20	101	20	20	101

$n = 1$

a) Converted from the concentration in the matrix standard solution

b) Ratio of peak area of pesticides in the presence of matrix to that in the absence of matrix

### 3.6 添加回収試験

2.2 の 2)~4)のカルバリル標準原液，カルボフラン標準原液及びフェノブカルブ標準原液をアセトニトリル-水 (3+2) で正確に希釈し添加に用いた。

肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしについて，カルバリルとして 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.1 及び 1 ng/mL），カルボフランとして 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.1 及び 0.5 ng/mL），フェノブカルブとして 0.01 及び 0.3 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.1 及び 3 ng/mL），小麦について，カルバリルとして 0.01 及び 2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.1 及び 20 ng/mL），カルボフランとして 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終

試料溶液中で 0.1 及び 2 ng/mL) , フェノブカルブとして 0.01 及び 0.3 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 3 ng/mL) , マイロについて, カルバリルとして 0.01 及び 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 100 ng/mL) , カルボフランとして 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 1 ng/mL) , フェノブカルブとして 0.01 及び 0.3 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 3 ng/mL) , オーツ乾草について, カルバリルとして 0.1 及び 250 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 250 ng/mL) , カルボフランとして 0.1 及び 13 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 13 ng/mL) , フェノブカルブとして 0.1 及び 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 10 ng/mL) になるようにそれぞれ添加後よく混合し, 一夜静置した後に本法に従って定量し, 平均回収率及び繰返し精度を求めた.

その結果は Table 6 のとおり, カルバリルの平均回収率は 86.6~103 %, その繰返し精度は  $RSD_r$  として 10 %以下, カルボフランの平均回収率は 91.3~105 %, その繰返し精度は  $RSD_r$  として 7.4 %以下, フェノブカルブの平均回収率は 85.5~99.1 %, その繰返し精度は  $RSD_r$  として 11 %以下の成績が得られ, 飼料分析基準の妥当性確認法ガイドライン<sup>7)</sup> (以下「妥当性確認法ガイドライン」という.) に定められた真度及び併行精度の目標値を満たしていた.

なお, 得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した.

Table 6 Recoveries for carbaryl, carbofron and fenobucarb

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types									
		Formula feed for cattle		Wheat		Corn		Milo		Oaten hay	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)								
Carbaryl	0.01	89.6	7.2	92.6	8.8	96.0	10	90.6	7.2	—	—
	0.1	96.9	2.5	—	—	96.2	4.5	—	—	86.6	6.6
	2	—	—	92.9	4.0	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	96.4	1.1	—	—
	250	—	—	—	—	—	—	—	—	103	1.1
Carbofuran	0.01	93.2	6.6	95.1	6.5	105	7.4	97.8	4.3	—	—
	0.05	95.8	3.7	—	—	94.0	1.2	—	—	—	—
	0.1	—	—	—	—	—	—	93.4	6.9	92.8	5.0
	0.2	—	—	91.3	1.9	—	—	—	—	—	—
	13	—	—	—	—	—	—	—	—	95.7	2.1
Fenobucarb	0.01	89.4	6.8	85.5	11	92.9	7.3	86.8	7.3	—	—
	0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	95.3	5.5
	0.3	95.0	1.3	91.8	2.7	94.3	3.1	95.6	2.2	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	99.1	2.6

—: Not tested

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

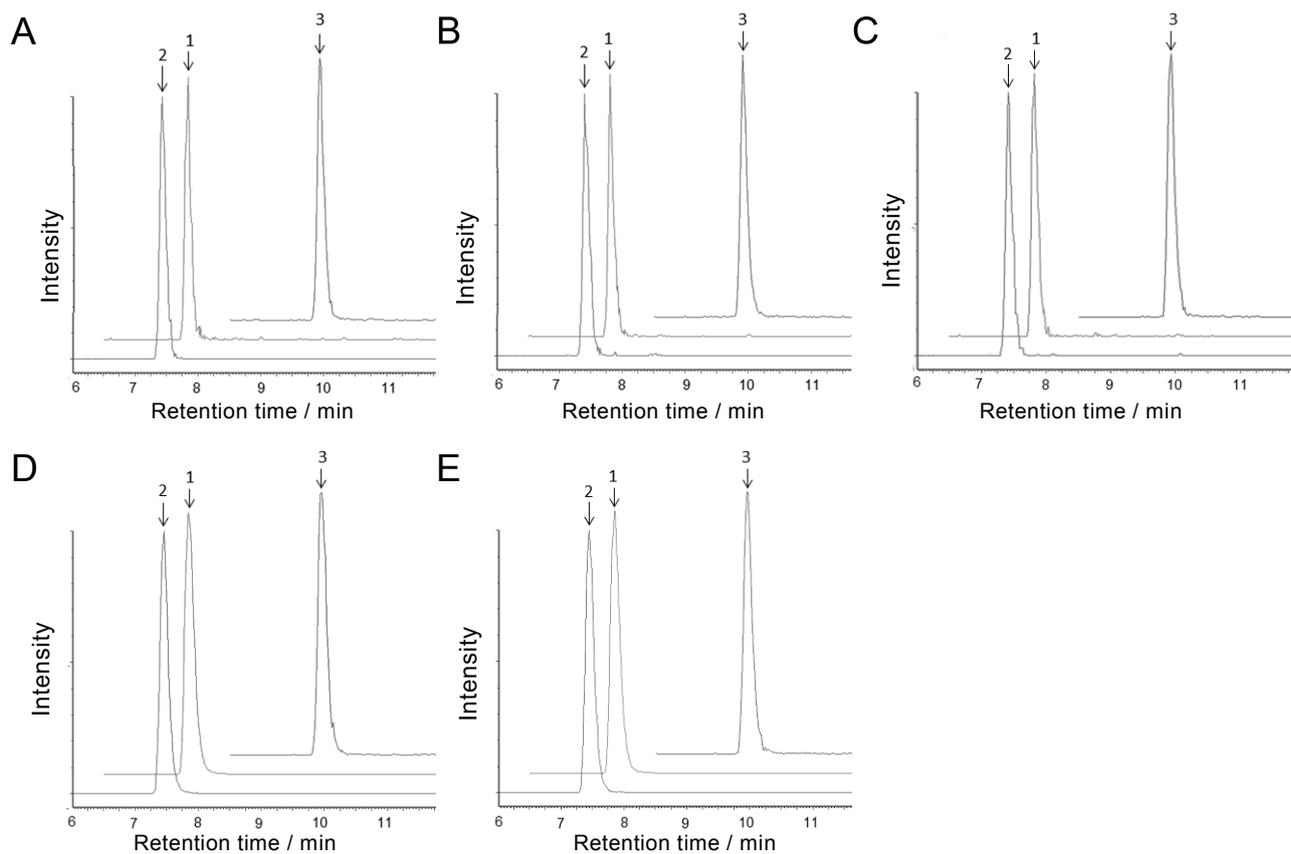


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms of standard solutions and spiked samples (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peak of 1: carbaryl, 2: carbofuran and 3: fenobucarb. Each peak is shown as 100 % in each segment. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (The concentrations of carbaryl, carbofuran and fenobucarb are 1 ng/mL, 0.5 ng/mL and 0.3 ng/mL, respectively.)

B: Sample solution of formula feed for cattle spiked at 0.1 mg/kg of carbaryl, 0.05 mg/kg of carbofuran and 0.3 mg/kg of fenobucarb (corresponding to 1 ng/mL as carbaryl, 0.5 ng/mL as carbofuran and 0.3 ng/mL as fenobucarb)

C: Sample solution of corn spiked at 0.1 mg/kg of carbaryl, 0.05 mg/kg of carbofuran and 0.3 mg/kg of fenobucarb (corresponding to 1 ng/mL as carbaryl, 0.5 ng/mL as carbofuran and 0.3 ng/mL as fenobucarb)

D: Standard solution (The concentrations of carbaryl, carbofuran and fenobucarb are 250 ng/mL, 13 ng/mL and 10 ng/mL, respectively.)

E: Sample solution of oaten hay spiked at 250 mg/kg of carbaryl, 13 mg/kg of carbofuran and 10 mg/kg of fenobucarb (corresponding to 250 ng/mL as carbaryl, 13 ng/mL as carbofuran and 10 ng/mL as fenobucarb)

### 3.7 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、肉用牛肥育用配合飼料、小麦、とうもろこし、マイロ及びオーツ乾草にカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブを添加し、添加回収試験により得られるピークのSN比が10及び3となる濃度を求めた。

その結果、SN比が10及び3となる濃度は、カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブともに、オーツ乾草以外の試料については0.01 mg/kg及び0.003 mg/kg、オーツ乾草については0.1 mg/kg及び0.03 mg/kgであったことから、試料中で定量下限は0.01 mg/kg（乾牧草については0.1 mg/kg）、検出下限は0.003 mg/kg（乾牧草については0.03 mg/kg）であった。設定した定量下限は、省令<sup>4)</sup>に定められた飼料中のカルボフランの基準値の最小濃度0.05 mg/kgに対して1/5の濃度であり、妥当性確認法ガイドラインに規定された目標を満たしていた。検出下限についても同様に目標を満たしていた。

なお、Table 6 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった。

#### 4 まとめ

飼料に残留するカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブについて、JFRL法及びイネ法を基に、LC-MS/MSを用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、抽出後の試料溶液を10倍希釈しないこと（乾牧草を除く）及びカラム処理における溶出溶媒量を10 mLから9 mLに変更することで、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線は、0.04~600 ng/mL（注入量として0.0002~3 ng）の範囲で直線性を示した。  
なお、当該検量線の濃度範囲は、カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブを0.004~60 mg/kg含有する分析用試料を、本法に従い調製した最終試料溶液中のカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブ濃度範囲に相当する。
- 2) 成鶏飼育用配合飼料、種豚飼育用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料、えん麦、大麦、小麦、とうもろこし、マイロ、ライ麦、アルファルファ乾草及びオーツ乾草について、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 本法に従い得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 4) 肉用牛肥育用配合飼料、小麦、とうもろこし、マイロ及びオーツ乾草にカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブとして0.01~250 mg/kg相当量を添加し、本法に従って5点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 5) 本法のカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブの定量下限は試料中で0.01 mg/kg（乾牧草については0.1 mg/kg）、検出下限は0.003 mg/kg（乾牧草については0.03 mg/kg）であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた。

#### 文 献

- 1) 一般社団法人日本植物防疫協会：農薬ハンドブック 2016年版（改訂新版），420-421，日本植物防疫協会，東京，(2016) (ISBN: 978-4-88926-146-2).
- 2) 内閣府食品安全委員会：食品安全総合情報システム，  
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/foodSafetyMaterial/show/syu02850270108>, cited 21 Dec. 2016.

- 3) 食品安全委員会農薬専門調査会，食品安全委員会動物用医薬品専門調査会：農薬・動物用医薬品評価書 (2013).
- 4) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令の施行について，平成 18 年 5 月 26 日，18 消安第 2321 号 (2006).
- 6) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 7) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 8) 財団法人日本食品分析センター：平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 (2010).
- 9) 榑原 良成：飼料用イネ中のカルバリル他 8 成分の農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法，飼料研究報告，37，19-45 (2012).

**技術レポート****2 飼料中の 3-OH カルボフランの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発**

保田 伊世\*, 長久保 眞平\*

**Development of Determination Method of 3-Hydroxycarbofuran in Feed by LC-MS/MS**

Iyo YASUDA\* and Shinpei NAGAKUBO\*

(\* Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

An analytical method was developed to determine the level of 3-hydroxycarbofuran in feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

3-Hydroxycarbofuran was extracted by boiling hydrochloric acid (1:29) and the extracted solution was filtered. The filtrate was diluted with hydrochloric acid (1:29) to a volume of 200 mL. The sample solution was purified with two other types of SPE columns (InertSep K-solute, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan and Sep-Pak Plus Silica cartridge, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into the LC-MS/MS to determine the level of 3-hydroxycarbofuran. LC separation was carried out on an ODS column (Mightysil RP-18 GP, 2.0 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Kanto Chemical Co., Inc.; Tokyo, Japan) using a gradient with 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Spike tests were conducted on formula feeds (for growing pigs and for dairy cattle), wheat, corn, alfalfa hay, rice straw and whole-crop rice silage. 3-Hydroxycarbofuran was spiked at the levels of 0.01 or 0.05 mg/kg for formula feeds and corn, 0.01 or 0.1 mg/kg for wheat, 0.01 or 13 mg/kg for alfalfa hay, 0.01 or 0.4 mg/kg for rice straw, and 0.004 or 0.6 mg/kg air-dry matter for whole-crop rice silage, respectively. The mean recoveries of 3-hydroxycarbofuran ranged from 82.2 to 91.3 %. The relative standard deviations of repeatability (RSD<sub>r</sub>) were not more than 6.1 %.

**Key words:** 3-hydroxycarbofuran; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed

**キーワード:** 3-OH カルボフラン; 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計; エレクトロスプレーイオン化法; 飼料

**1 緒 言**

3-OH カルボフラン (3-ヒドロキシカルボフラン) は、カーバメート系殺虫剤であるカルボフラン誘導体のカルボスルファン、フラチオカルブ及びベンフラカルブの代謝体である<sup>1), 2)</sup>。カルボスルファンは米国 FMC 社, フラチオカルブは Ciba-Geigy 社 (現: Syngenta 社), ベンフラカルブは大塚化学株式会社 (現: OAT アグリオ株式会社) によって開発された<sup>2)</sup>。カルボフランも FMC 社によって開発された農薬であるが, 日本での登録はない。また, フラチオカルブは 2006 年 1 月に国内での登録が失効している<sup>3)</sup>。

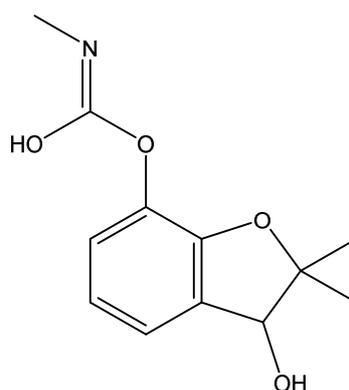
\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

我が国における飼料中の残留農薬に係る省令基準値<sup>4)</sup>は、上記 4 成分のうち、カルボフランについて設定されている。カルボフランの残留農薬基準値は、カルボフラン及び 3-OH カルボフランをカルボフラン含量に換算したものの和と規定され<sup>5)</sup>、牧草で 13 mg/kg、大麦及び小麦で 0.2 mg/kg、えん麦、マイロ及びライ麦で 0.1 mg/kg、とうもろこしで 0.05 mg/kg となっている。また、飼料中の管理基準値<sup>6)</sup>は、上記農薬 4 成分のうち、カルボスルファンについて設定されており、稲わらで 0.7 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で 1 mg/kg となっている。更に、カルボスルファン及びカルボフランに対する厚生労働省の規格基準における残留農薬基準値<sup>7)</sup>は、カルボスルファンが検出された場合に限り、カルボスルファン（カルボフラン及び 3-OH カルボフランをカルボスルファン含量に換算したものを含む。）として、玄米で 0.2 mg/kg となっている。また、カルボフラン又は 3-OH カルボフランが検出され、加えてカルボスルファン、フラチオカルブ又はベンフラカルブが検出されなかった場合に限り、カルボフラン及び 3-OH カルボフランをカルボフラン含量に換算したものの和として、玄米で 0.1 mg/kg となっている。

3-OH カルボフランは植物体中に一部配糖体として存在し、有機溶媒では完全に抽出することができない。そのため、塩酸を添加して加熱することで配糖体を加水分解し、抽出する方法が採用されており<sup>8)-12)</sup>、飼料分析基準には既に、ポストカラム蛍光誘導体化液体クロマトグラフで定量する方法が収載されている<sup>12)</sup>。しかし、飼料分析基準に収載されている方法は、開発当時、飼料用イネを検討対象としていなかった。また、測定機器についても、より汎用性のあるものが望ましい。

今回、財団法人日本食品分析センターが平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発事業において開発した、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）を用いた定量法<sup>13)</sup>（以下「JFRL 法」という。）を基に、飼料分析基準への収載を目途とした分析法の開発等について検討したので、その概要を報告する。

参考に 3-OH カルボフランの構造式等を Fig. 1 に示した。



2,3-dihydro-3-hydroxy-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl  
methylcarbamate

C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub> MW: 237.3 CAS No.: 16655-82-6

Fig. 1 Chemical structure of 3-hydroxycarbofuran

## 2 実験方法

### 2.1 試料

配合飼料（肉豚肥育用及び乳用牛飼育用）、小麦、とうもろこし、乾牧草（アルファルファ乾

草，スーダングラス乾草及びチモシー乾草）及び稲わらはそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した．WCRS は 60 °C で 10 時間乾燥後，更に室内に静置して風乾した後，同様に粉砕した．

なお，検討に用いた配合飼料の例を Table 1 に示した．

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For growing pigs	Grains	77	Corn, milo, wheat flour, wheat, barley
	Oil seed meal	21	Soybean meal, rapeseed meal
	Animal by-products	1	Fish meal
	Others	1	Animal fat, calcium carbonate, salt, calcium phosphate, feed additives
For dairy cattle	Grains	48	Heat-treated corn, wheat flour, corn, milo
	Brans	24	Wheat bran, corn gluten feed, rice bran
	Oil seed meal	23	Soybean meal, rapeseed meal
	Others	5	Molasses, calcium carbonate, salt, feed additives

## 2.2 試薬

1) アセトニトリル及びメタノールは LC-MS 用を用いた．アセトン，酢酸エチル及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた．酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用（1 mol/L 水溶液，関東化学製及び和光純薬工業製）を用いた．塩酸は試薬特級を用いた．沸騰石は化学用（和光純薬工業製）を用いた．シリコン油は SRX310（東レ・ダウコーニング製）を用いた．水は Milli-Q Integral 5（Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた．

### 2) 3-OH カルボフラン標準液

3-OH カルボフラン標準品（純度 99.0 %，和光純薬工業製）10 mg 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 3-OH カルボフラン標準原液を調製した（この液 1 mL は，3-OH カルボフランとして 0.1 mg を含有する．）．

使用に際して，3-OH カルボフラン標準原液 4 mL を 20 mL の全量フラスコに正確に入れ，更に標線までメタノールを加えて，1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 20 µg を含有する液を調製した．この液の一定量を，アセトニトリルで正確に希釈し，1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 及び 20 ng を含有する各標準液を調製した．

## 2.3 装置及び器具

### 1) 粉砕機：

粉砕機 1（配合飼料，小麦及びとうもろこし用）：ZM-200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）

粉砕機 2（乾牧草，稲わら及び WCRS 用）：SM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数（仕様）1500 rpm）

- 2) ガラス繊維ろ紙：GFP-95 桐山製作所製
- 3) 多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute (5 mL 保持用) ジーエルサイエンス製
- 4) シリカゲルミニカラム：Sep-Pak Plus Silica (充てん剤量 690 mg) Waters 製にリザーバーを連結したもの
- 5) LC-MS/MS：  
LC 部：ACQUITY UPLC System Waters 製  
MS/MS 部：Xevo TQD Waters 製

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

分析試料 5 g を正確に量って 500 mL のなす形フラスコに入れ、塩酸 (1+29) 130 mL, 沸騰石 3~4 粒及びシリコン油約 1 mL を加え、還流冷却器に接続し、1 時間加熱抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をガラス繊維ろ紙で吸引ろ過した後、先のなす形フラスコ及び残さを順次塩酸 (1+29) - アセトン (5+2) 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線まで塩酸 (1+29) を加えた。この液 2 mL を 10 mL の試験管に正確に入れ、塩酸 (1+29) 2 mL を加えて、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

### 2) カラム処理 I

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに入れ、10 分間静置した。100 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていた試験管をヘキサン-酢酸エチル (1+1) 5 mL ずつで 4 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して 3-OH カルボフランを溶出させた。更に同溶媒 20 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

酢酸エチル 1 mL を加えて残留物を溶かした後、ヘキサン 9 mL を加えて、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

### 3) カラム処理 II

シリカゲルミニカラムを酢酸エチル 5 mL 及びヘキサン 5 mL で順次洗浄した (必要に応じ、流速が 1 mL/min 程度になるよう吸引した。以下同様。)

試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-酢酸エチル (3+2) 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して 3-OH カルボフランを溶出させた。更に同溶媒 5 mL をミニカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

### 4) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各 3-OH カルボフラン標準液各 2 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (以下「SRM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 及び 3 に示した。

なお、多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分の確認を行った場合及び WCRS に原物換算して 0.6 mg/kg 相当量の 3-OH カルボフランを添加した場合は、上記 3) で流出液に窒素ガスを送って乾固した後、アセトニトリル 20 mL を正確に加えて残留物を溶かし、LC-MS/MS によ

る測定に供する試料溶液とした（以下「10 倍希釈試料溶液」という．）．また、アルファルファ乾草に 13 mg/kg 相当量の 3-OH カルボフランを添加した場合は、上記 3) で得られた試料溶液の一部を更にアセトニトリルで正確に 100 倍希釈し、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした（以下「100 倍希釈試料溶液」という．）．

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Mightysil RP-18 GP (2.0 mm i.d. × 150 mm, 5 μm), Kanto Chemical
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate solution – acetonitrile (95:5) → 10 min → (10:90) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	150 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (1000 L/h, 500 °C)
Capillary voltage	3.1 kV
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.4 Pa)

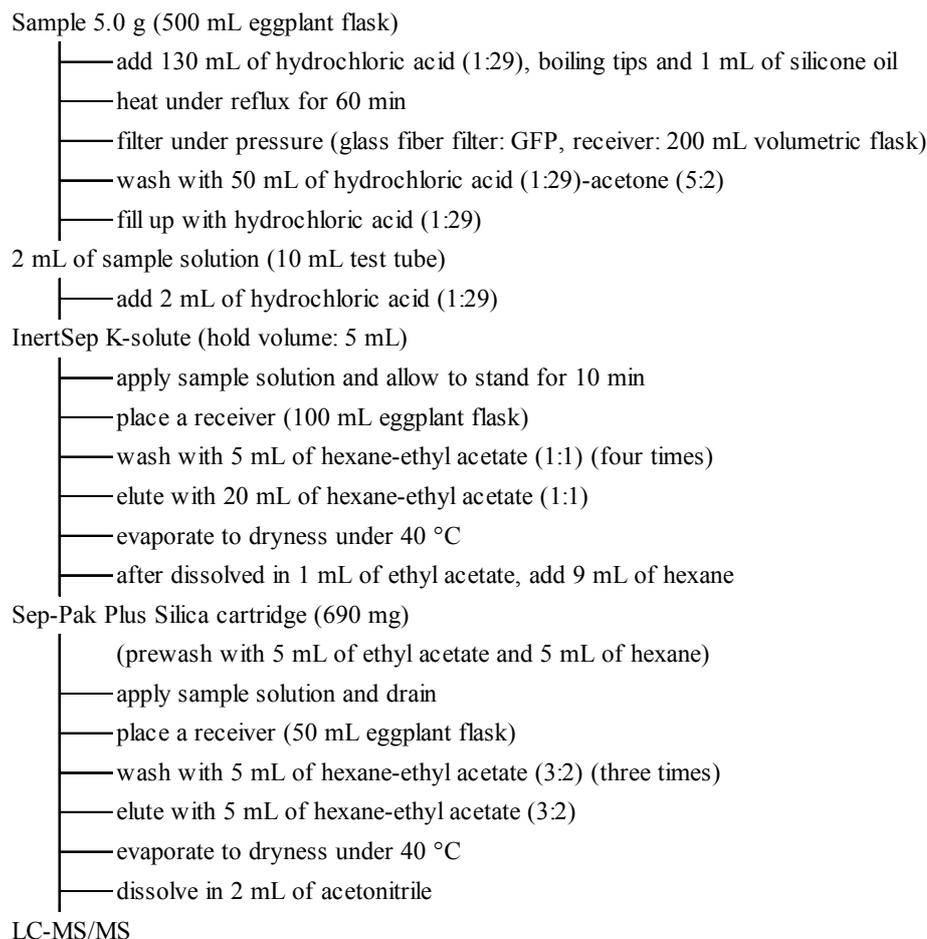
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifer ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )		
3-Hydroxycarbofuran	238	163	—	28	14
		—	181	28	10

## 5) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の 3-OH カルボフラン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for 3-hydroxycarbofuran in feed

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

2.2 の 2)に従って調製した各 3-OH カルボフラン標準液 2  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。得られた検量線の一例は、Fig. 2 のとおりであり、3-OH カルボフランは各 0.1~20 ng/mL (注入量として 0.2~40 pg 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、3-OH カルボフランを 0.004~0.8 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の 3-OH カルボフラン濃度範囲に相当する。

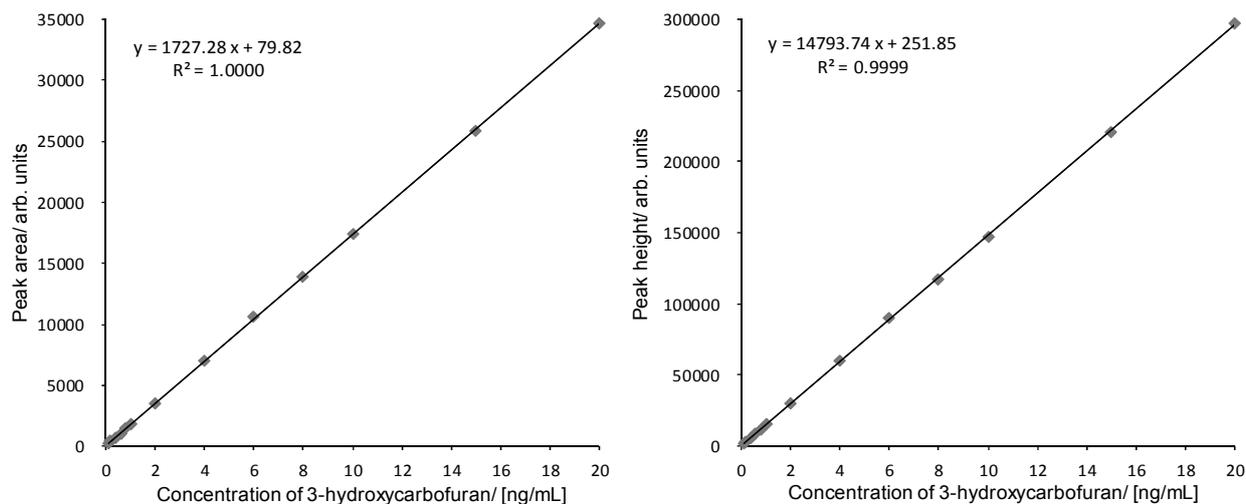


Fig. 2 Calibration curves of 3-hydroxycarbofuran by peak area (left) and peak height (right)

### 3.2 妨害物質の検討

配合飼料（肉豚肥育用及び乳用牛飼育用），小麦，とうもろこし，アルファルファ乾草，稲わら及び WCRS 各 1 検体を試料として，2.4 により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し，得られた SRM クロマトグラムを確認したところ，いずれの試料においても 3-OH カルボフランの定量を妨げるピークは認められなかった。

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

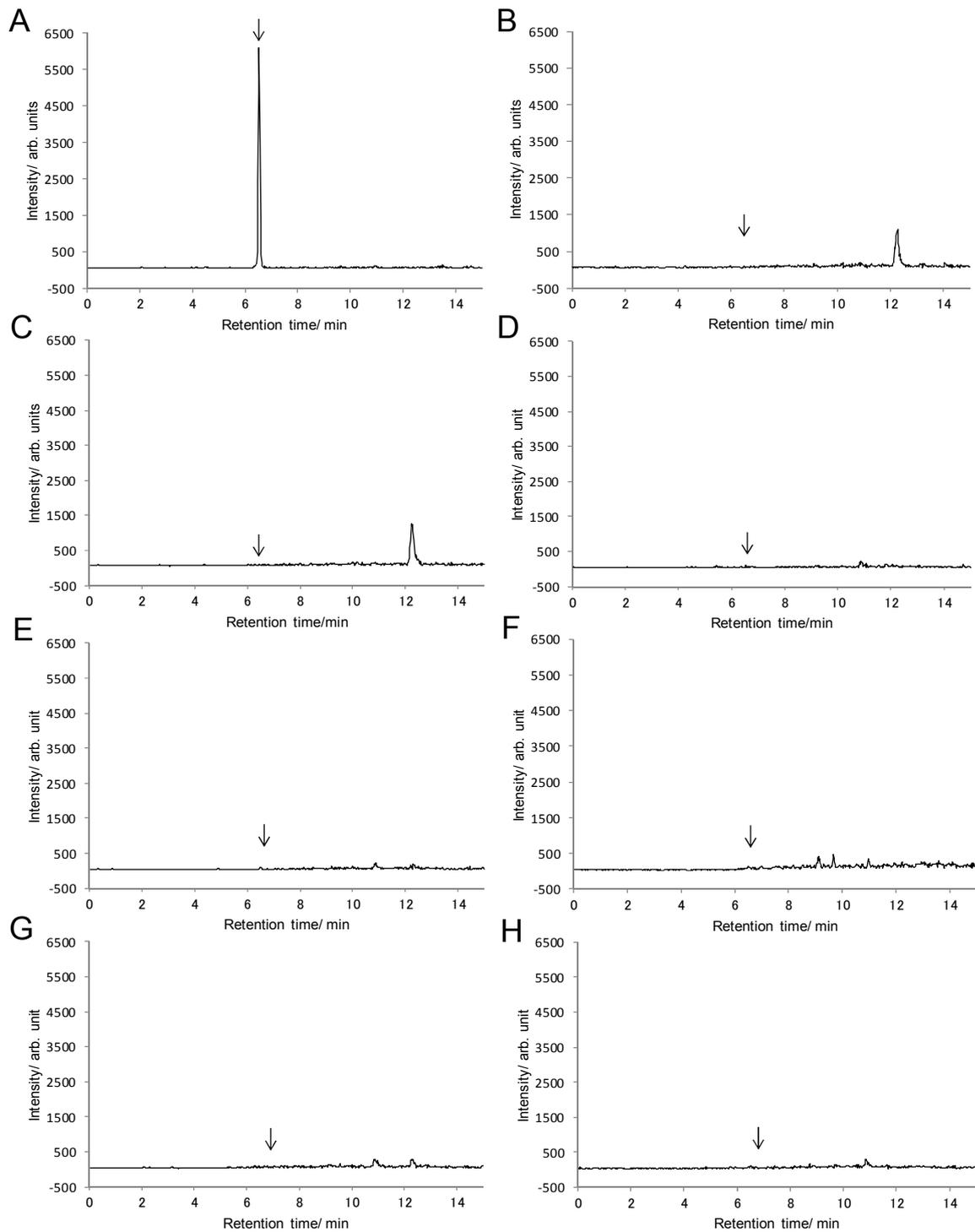


Fig. 3 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention time of 3-hydroxycarbofuran.)

A: Standard solution (0.25 ng/mL: 0.5 pg as 3-hydroxycarbofuran)

B~H: Sample solution (blank) (B: formula feed for growing pigs, C: formula feed for dairy cattle, D: wheat, E: corn, F: alfalfa hay, G: rice straw, H: whole-crop rice silage (WCRS))

### 3.3 マトリックス効果の確認

2.4 の 1), 2)及び 3)により調製した配合飼料, 小麦, とうもろこし, アルファルファ乾草, 稲わら及び WCRS の各ブランク試料溶液各 1 mL をそれぞれ 50 mL のなす形フラスコに入れ, 窒素ガスを送って乾固した. 2.2 の 2)に 従って調製した 1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 1 ng を含有する標準液 1 mL で残留物を溶かし, マトリックス標準液 (各試料に対して 0.04 mg/kg 添加相当量) を調製した. 各マトリックス標準液について, 2.2 の 2)に従って調製した同濃度の 3-OH カルボフラン標準液に対するピーク面積比を確認したところ, ピーク面積比は Table 4 のとおり, 100~108 %であり, 3-OH カルボフランは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった.

Table 4 Matrix effect of feeds

Feed types of matrix	Concentration of 3-hydroxycarbofuran		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample <sup>a)</sup> (mg/kg)	
Formula feed for growing pigs	1	0.04	100
Formula feed for dairy cattle	1	0.04	104
Wheat	1	0.04	108
Corn	1	0.04	100
Alfalfa hay	1	0.04	103
Rice straw	1	0.04	103
WCRS	1	0.04 <sup>c)</sup>	102

$n = 3$

a) Converted from the concentration in the matrix standard solution

b) Ratio of peak area of 3-hydroxycarbofuran in the presence of matrix to that in the absence of matrix

c) mg/kg air-dry matter

### 3.4 添加回収試験

2.2 の 2)の 3-OH カルボフラン標準原液をメタノール及びアセトニトリルで正確に希釈し添加に用いた.

3-OH カルボフランとして, 配合飼料 2 種類 (肉豚肥育用及び乳用牛飼育用) 及びとうもろこしに 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.25 及び 1.25 ng/mL), 小麦に 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.25 及び 2.5 ng/mL), アルファルファ乾草に 0.01 及び 13 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.25 及び 3.25 ng/mL), 稲わらに 0.01 及び 0.4 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.25 及び 10 ng/mL), WCRS に原物換算で 0.004 及び 0.6 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.25 及び 3.5 ng/mL) になるようにそれぞれ添加してよく混合し, 一夜静置した後本法に従って定量し, 平均回収率及び繰返し精度を求めた.

なお, WCRS に対する添加は風乾物試料に対して 3-OH カルボフランとして 0.02 及び 0.4 mg/kg 相当量になるよう行い, 原物中濃度への換算は, 原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 %及び 10 %と仮定して, 原物 (水分含有量 60 %) 中濃度 = 風乾物 (水分含有量 10 %) 中濃度 / 2.25 の式により行った.

その結果は Table 5 のとおり，平均回収率は 82.2~91.3 %，その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 6.1 %以下の成績が得られ，飼料分析基準の妥当性確認法ガイドライン<sup>12)</sup>（以下「妥当性確認法ガイドライン」という．）に規定された真度及び併行精度の目標値を満たしていた．

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した．

Table 5 Recoveries for 3-hydroxycarbofuran

Spiked level (mg/kg original matter)	Feed types							
	Formula feed for growing pigs		Formula feed for dairy cattle		Wheat		Corn	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)
0.01	87.4	4.8	83.0	4.0	85.8	2.8	88.6	1.3
0.05	84.8	2.3	82.2	2.3	—	—	88.1	2.3
0.1	—	—	—	—	91.3	4.2	—	—

Spiked level (mg/kg original matter)	Feed types					
	Alfalfa hay		Rice straw		WCRS <sup>c)</sup>	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)
0.004 <sup>d)</sup>	—	—	—	—	83.7	6.1
0.01	86.2	4.3	88.2	6.1	—	—
0.4	—	—	84.7	1.4	—	—
0.6 <sup>d)</sup>	—	—	—	—	83.4	1.3
13	83.3	1.1	—	—	—	—

—: Not tested

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

c) 3-Hydroxycarbofuran was spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction.

d) The spiked levels were 0.01 and 1.4 mg/kg air-dry matter. The levels of pesticides in original matter were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

The levels of 3-hydroxycarbofuran in original matter (moisture 60 %)

= the levels of 3-hydroxycarbofuran in air-dry matter (moisture 10 %) / 2.25

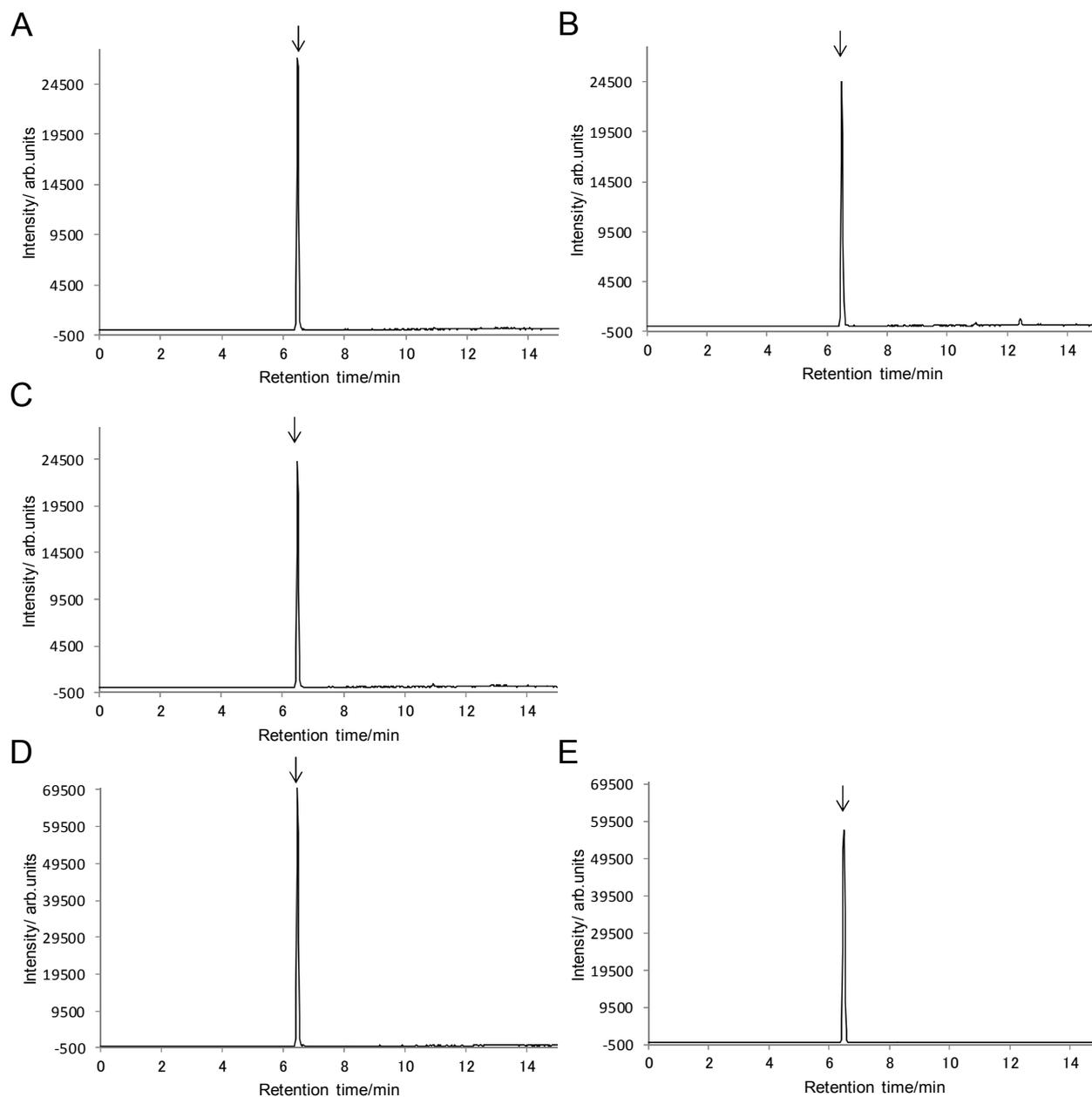


Fig. 4 SRM chromatograms of standard solutions and spiked samples

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3.

Arrows indicate the peak of 3-hydroxycarbofuran.)

A: Standard solution (The concentration is 1.25 ng/mL for 3-hydroxycarbofuran.)

B: Sample solution of formula feed for growing pigs spiked at 0.05 mg/kg of 3-hydroxycarbofuran (corresponding to 1.25 ng/mL as 3-hydroxycarbofuran)

C: Sample solution of corn spiked at 0.05 mg/kg of 3-hydroxycarbofuran (corresponding to 1.25 ng/mL as 3-hydroxycarbofuran)

D: Standard solution (corresponding to is 3.25 ng/mL as 3-hydroxycarbofuran)

E: Sample solution of alfalfa hay spiked at 13 mg/kg of 3-hydroxycarbofuran (corresponding to 3.25 ng/mL as 3-hydroxycarbofuran)

### 3.5 定量下限及び検出下限

直線性を示すことを確認した検量線の濃度範囲 0.1~20 ng/mL の下端付近濃度 (0.25 ng/mL (試料中で 0.01 mg/kg 相当量)) での添加回収試験の結果, 得られたピークの SN 比が 10 を超えていたため, 本法の定量下限は 0.01 mg/kg とした. 設定した定量下限濃度は, 飼料中のカルボフランの有害物質の省令基準における残留農薬基準値の最小濃度 0.05 mg/kg を 3-OH カルボフラン換算した値に対して 1/5 及びカルボスルファンの飼料中の管理基準値の最小濃度 0.7 mg/kg を 3-OH カルボフラン換算した値に対して 1/44 であり, 妥当性確認法ガイドラインに規定された目標を満たしていた.

また, 添加回収試験より得られたピークから SN 比が 3 となる濃度を算出した結果, 試料 (WCRS は風乾物) 中の検出下限は 0.002 mg/kg であり, 同様に妥当性確認法ガイドラインに規定された目標を満たしていた.

なお, Table 5 に示したとおり, 当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった.

## 4 まとめ

飼料中に残留する 3-OH カルボフランについて, JFRL 法を基に, LC-MS/MS を用いた定量法の開発等について検討したところ, JFRL 法と同様の方法で以下の結果が得られた.

1) 検量線は, 0.1~20 ng/mL (注入量として 0.2~40 pg) の範囲で直線性を示した.

なお, 当該検量線の濃度範囲は, 3-OH カルボフランを 0.004~0.8 mg/kg 含有する分析用試料を, 本法に従い調製した最終試料溶液中の 3-OH カルボフラン濃度範囲に相当する.

2) 配合飼料 2 種類 (肉豚肥育用及び乳用牛飼育用), 小麦, とうもろこし, アルファルファ乾草, 稲わら及び WCRS について, 本法に従って得られたクロマトグラムには, 定量を妨げるピークは認められなかった.

3) 本法に従い得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果, 3-OH カルボフランは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった.

4) 飼料中に 3-OH カルボフランとして, 配合飼料 (肉豚肥育用及び乳用牛飼育用) 及びとうもろこしに 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量, 小麦に 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量, アルファルファ乾草に 0.01 及び 13 mg/kg 相当量, 稲わらに 0.01 及び 0.4 mg/kg 相当量, WCRS に原物換算して 0.004 及び 0.6 mg/kg 相当量を添加し, 本法に従って 5 点併行分析を実施し, 回収率及び繰返し精度を求めたところ, 妥当性確認法ガイドラインに規定された目標値を満たす良好な結果が得られた.

5) 本法の 3-OH カルボフランの定量下限は試料中 (WCRS は風乾物) で 0.01 mg/kg, 検出下限は 0.002 mg/kg であった. 設定した定量下限及び検出下限は, 妥当性確認法ガイドラインに規定された目標を満たしていた.

## 文 献

- 1) 内閣府食品安全委員会: 共通代謝物を有する農薬の評価方法について (案), <http://www.fsc.go.jp/fsciis/meetingMaterial/show/kai20060719no1>, cited 21 Dec. 2016.
- 2) 農薬ハンドブック 2005 年版編集委員会: 農薬ハンドブック 2005 年版, 東京, 日本植物防疫協会, 51-56 (2005) (ISBN: 978-4889260991).

- 3) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：登録失効有効成分，  
<http://www.acis.famic.go.jp/toroku/sikkouseibun.htm>, cited 21 Dec. 2016.
- 4) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令の施行について，平成 18 年 5 月 26 日，18 消安第 2321 号 (2006).
- 6) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 7) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959).
- 8) 上路 雅子，小林 裕子，中村 幸二：残留農薬分析法，東京，ソフトサイエンス社，90-94 (2001) (ISBN 4-8817-1097-4).
- 9) 農薬残留分析法研究班編：最新農薬の残留分析法，東京，中央法規出版，110-112 (1995) (ISBN 4-8058-1321-0).
- 10) 後藤 真康，加藤 誠哉：増補 残留農薬分析法，東京，ソフトサイエンス社，32-35 (1987).
- 11) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について，平成 17 年 1 月 24 日，食安発 0124001 号 (2005).
- 12) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 13) 財団法人日本食品分析センター：平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発事業 (2010).

## 技術レポート

## 3 飼料中のイミダクロプリドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の妥当性確認

中村 哲<sup>\*1</sup>, 井上 智江<sup>\*2</sup>Method Validations of the Determination Method of Imidacloprid by LC-MS  
for Wheat, Rice Straw and Whole-crop Rice SilageSatoru NAKAMURA<sup>\*1</sup> and Tomoe INOUE<sup>\*2</sup>(\*<sup>1</sup> Kobe Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),  
(Now Food Labeling Monitoring Department, FAMIC)\*<sup>2</sup> Kobe Regional Center, FAMIC)

A method validation of determination method of imidacloprid by liquid chromatograph-electrospray ionization-mass spectrometer (LC-ESI-MS), which had been listed in analytical standards of feeds, was conducted for application to wheat, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS).

Imidacloprid was extracted with acetonitrile-water (13:7) and the extracted solution was filtered. The filtrate was diluted with acetonitrile to a volume of 200 mL (100 mL for wheat). The sample solutions of rice straw and WCRS were diluted 10-fold with acetonitrile. The sample solution was purified with liquid-liquid extraction and two types of SPE columns (Supelclean LC-18, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA and ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA), and injected into the LC-MS to determine the level of imidacloprid. LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 3.0 mm i.d. × 250 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.) using a gradient with 5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution and 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution as a mobile phase. In the MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Spike tests were conducted on wheat, rice straw and WCRS. Imidacloprid was spiked at the levels of 0.005 or 0.2 mg/kg for wheat, 0.01 or 10 mg/kg for rice straw, and 0.009 or 3 mg/kg original matter for WCRS, respectively. The mean recoveries of imidacloprid ranged from 69.1 to 87.9 %. The relative standard deviations of repeatability (RSD<sub>r</sub>) were not more than 3.8 %.

As a result of recoveries and RSD<sub>r</sub>, the method was validated for wheat and WCRS. However, recoveries for imidacloprid in rice straw were under 70 %. Furthermore, the dilution of sample solution was necessary to apply the method to rice straw and WCRS, regardless of imidacloprid concentration.

Key words: imidacloprid; liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS); electrospray ionization (ESI); wheat; rice straw; whole-crop rice silage

キーワード：イミダクロプリド；液体クロマトグラフ質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；小麦；稲わら；稲発酵粗飼料

\*<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター，現 表示監視部

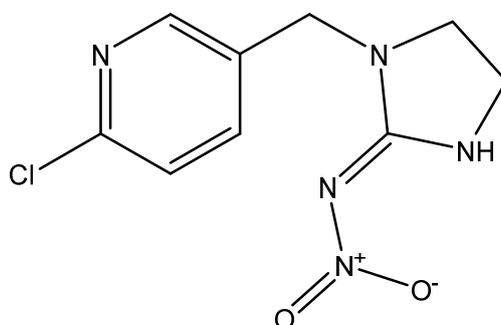
\*<sup>2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

## 1 緒 言

飼料中のイミダクロプリドの定量法については、液体クロマトグラフ質量分析計（以下「LC-MS」という。）による方法が開発され<sup>1)</sup>、平成 18 年に飼料分析基準として掲載された<sup>2)</sup>が、その後、平成 25 年にとうもろこし及び乾牧草でイミダクロプリドの残留基準値の改正が行われ、更に小麦についても残留基準値を見直す動きがある。また、稲わら及び稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）中のイミダクロプリドについては、飼料の有害物質の管理基準として、それぞれ 10 mg/kg 及び 3 mg/kg と定められている<sup>3)</sup>。一方、定量法の開発時の検討<sup>1), 2)</sup>及び財団法人日本食品分析センターの「平成 18 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業」における検討<sup>4)</sup>では、イミダクロプリドを高濃度で添加した小麦の添加回収試験を行っておらず、稲わら及び WCRS については検討が行われていなかった。

以上を考慮し、今回、飼料中のイミダクロプリドの LC-MS による定量法について、小麦、稲わら及び WCRS の 3 種の飼料原料への適用を検討したので、その概要を報告する。

参考にイミダクロプリドの構造式等を Fig. 1 に示した。



(E)-1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine

C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub> MW: 255.7 CAS No.: 138261-41-3

Fig. 1 Chemical structure of imidacloprid

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

小麦及び稲わらはそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。WCRS は 60 °C で 10~21 時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉砕した。

### 2.2 試 薬

1) アセトニトリル及びトルエンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。塩化ナトリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸ナトリウム（無水）及び酢酸アンモニウムは試薬特級を用いた。メタノールは液体クロマトグラフ用を用いた。水は Millipore, DIRECT-Q UV 3（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

#### 2) イミダクロプリド標準液

イミダクロプリド標準品（純度 99.6 %，関東化学製）10 mg 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イミダクロプリド標準原液を調製した（この液 1 mL は、イミダクロプリドとして 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で正確に希釈し、1 mL 中にイミダクロプリドとしてそれぞれ 0.002~0.2  $\mu\text{g}$  を含有する各標準液を調製した。

## 2.3 装置及び器具

### 1) 粉碎機：

粉碎機 1 (小麦用)：ZM 200 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)

粉碎機 2 (稲わら及び WCRS 用)：SM 2000 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

2) 振とう機：理研式シェーカー MW-DRV 宮本理研工業製 (使用時振とう数 300 rpm)

3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：Supelclean LC-18 (充てん剤量 500 mg) Sigma-Aldrich 製

4) グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (充てん剤量 500 mg/500 mg) Sigma-Aldrich 製

### 5) LC-MS：

LC 部：LC-20AB 島津製作所製

MS 部：LCMS-2010EV 島津製作所製

## 2.4 定量方法

飼料分析基準第 6 章第 1 節 28.1 の方法により定量した。LC-MS の測定条件を Table 1 に示した。なお、稲わら及び WCRS は、乾牧草の方法に準じて実施した。また、液液分配に供する試料溶液の調製については、以下のとおり実施した。

イミダクロプリドを 10 mg/kg の濃度で添加した稲わら及び原物換算して 3 mg/kg の濃度で添加した WCRS にあつては、アセトニトリルで 200 mL に定容した後の溶液の一部をアセトニトリルで正確に 20 倍希釈した溶液を液液分配に供する試料溶液とした。

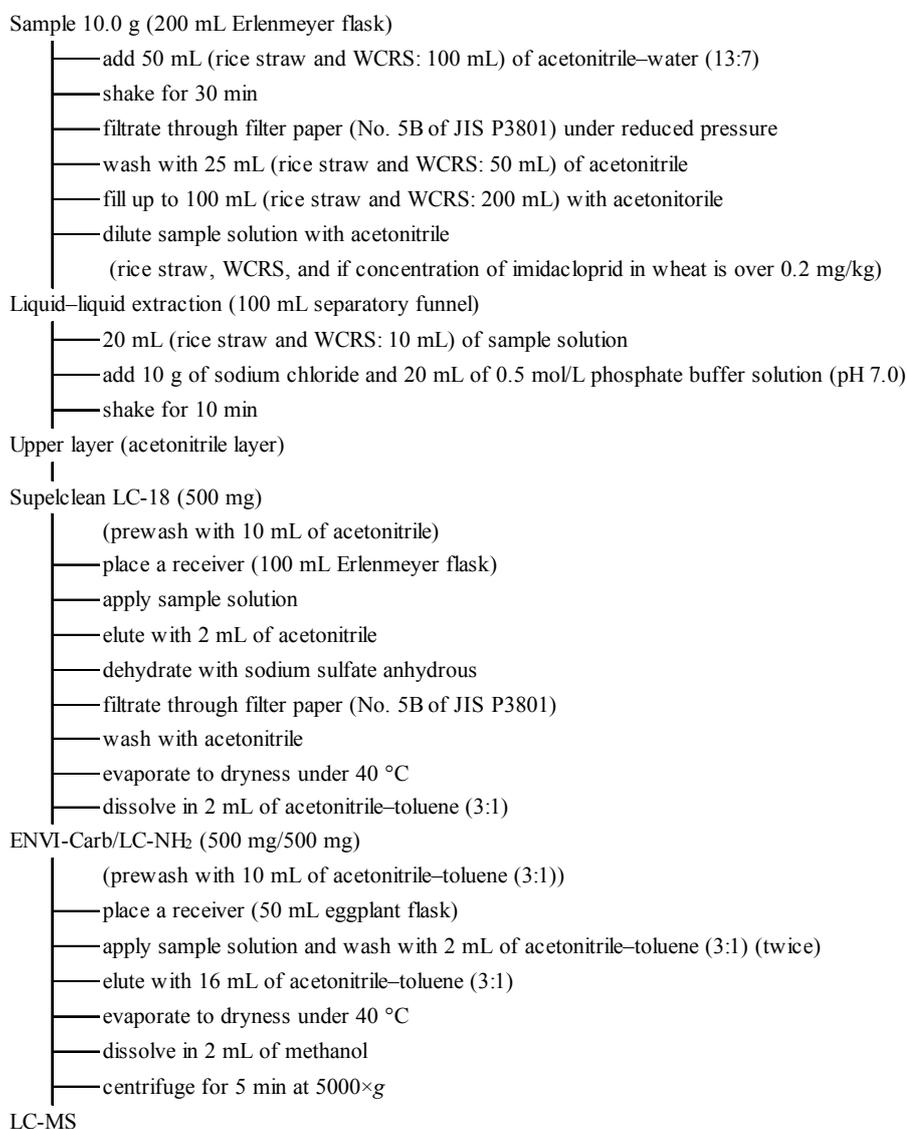
イミダクロプリドを 0.2 mg/kg の濃度で添加した稲わら及び原物換算して 0.09 mg/kg の濃度で添加した WCRS にあつては、アセトニトリルで 200 mL に定容した後の溶液を液液分配に供する試料溶液としたが、これとは別に、アセトニトリルで 200 mL に定容した後の溶液の一部をアセトニトリルで正確に 10 倍希釈した溶液についても液液分配に供した。

イミダクロプリドを添加していない稲わら及び WCRS にあつては、アセトニトリルで 200 mL に定容した後の溶液の一部をアセトニトリルで正確に 10 倍希釈した溶液を液液分配に供した。

定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Table 1 Operating conditions of LC-MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm i.d. × 250 mm, 5 μm), Agilent Technologies
Mobile phase	5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution–5 mmol/L ammonium acetate methanol solution (17:3) → 1 min → (3:2) (hold for 2.5 min) → 2.5 min → (1:1) → 2 min → (9:11) → 9.5 min → (1:19) (hold for 12.5 min) → (17:3) (hold for 17 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizing gas	N <sub>2</sub> (2.5 L/min)
Drying gas	N <sub>2</sub> (10 L/min)
Heat block temperature	200 °C
Curved desolvation line temperature	250 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 256



Scheme 1 Analytical procedure for imidacloprid in feed

### 3 結果及び考察

#### 3.1 妨害物質の検討

小麦 2 検体, 稲わら 2 検体及び WCRS 2 検体を試料として, 2.4 により調製した試料溶液を LC-MS に注入し, 得られた選択イオン検出 (以下「SIM」という.) クロマトグラムを確認したところ, 小麦 1 検体において 0.001 mg/kg 相当, 稲わら 1 検体において 0.006 mg/kg 相当の微小ピークが認められたが, 飼料分析基準別表 3 試験法の妥当性確認法ガイドライン<sup>2)</sup> (以下「妥当性確認法ガイドライン」という.) に示された許容範囲内であった. 他の試料では妨害物質は認められなかった.

なお, 得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した.

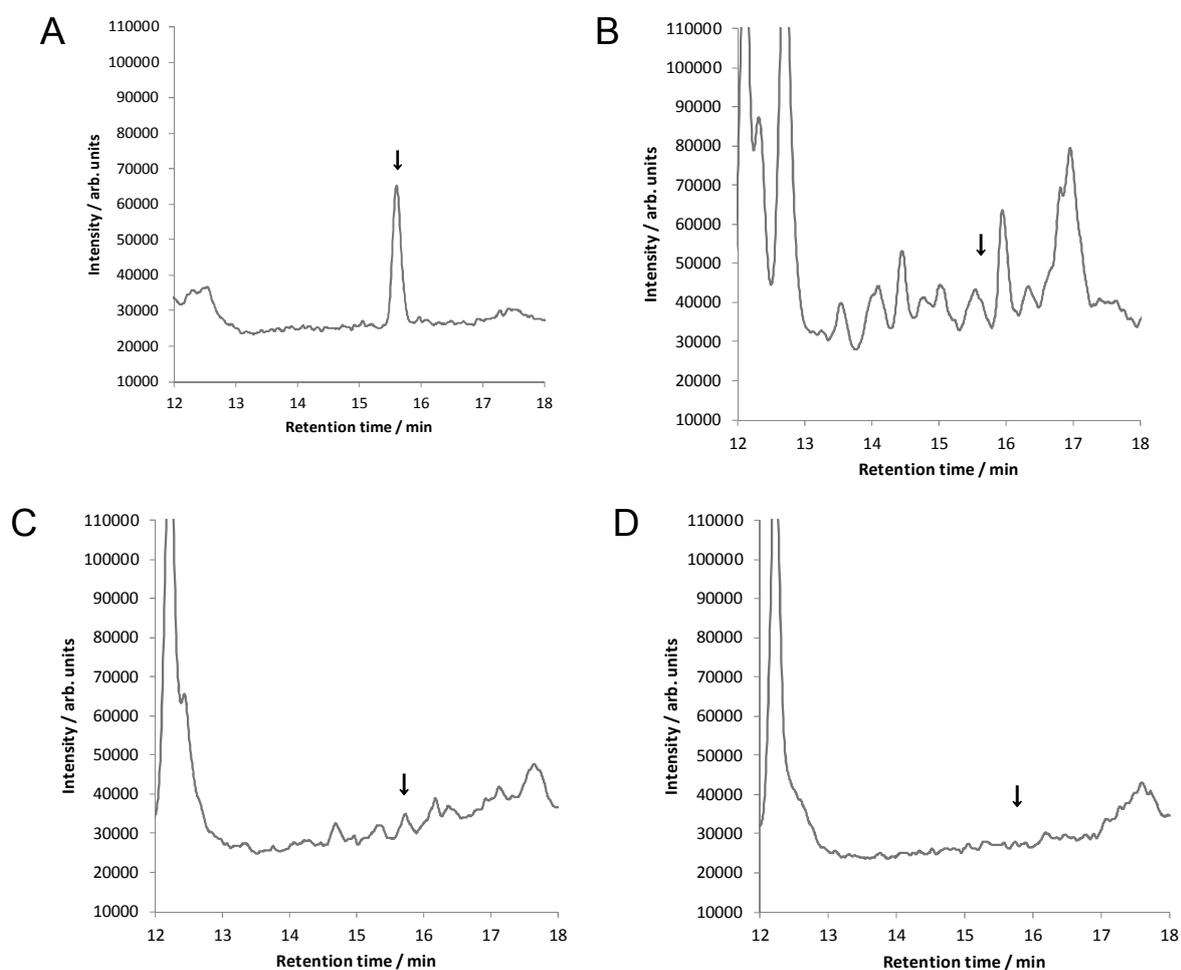


Fig. 2 Selected ion monitoring (SIM) chromatograms of standard solution and blank sample solutions

(LC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the retention time of imidacloprid.)

- A: Standard solution (0.004  $\mu\text{g/mL}$ : 0.02 ng as imidacloprid)
- B: Wheat
- C: Rice straw
- D: WCRS

### 3.2 マトリックス効果の確認

2.4 により調製した小麦 2 検体, 稲わら 2 検体及び WCRS 2 検体のブランク試料溶液にイミダクロプリドとして, 小麦に 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.2 µg/mL), 稲わらに 8 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.2 µg/mL), WCRS に 7 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.175 µg/mL) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について, 2.2 の 2) に従って調製した同濃度のイミダクロプリド標準液に対するピーク面積比を確認した. その結果, ピーク面積比は Table 2 のとおり, 91~104 % であり, 試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった.

Table 2 Matrix effect of samples

Feed types of matrix	Concentration of imidacloprid		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)
	in matrix standard solution (µg/mL)	in sample <sup>a)</sup> (ng/mL)	
Wheat 1	0.2	0.2	91
Wheat 2	0.2	0.2	92
Rice straw 1	0.2	8	104
Rice straw 2	0.2	8	100
WCRS 1	0.175	7 <sup>c)</sup>	104
WCRS 2	0.175	7 <sup>c)</sup>	98

$n = 3$

a) Converted from the concentration in the matrix standard solution

b) Ratio of peak area of imidacloprid in the presence of matrix to that in the absence of matrix

c) mg/kg air-dry matter

### 3.3 添加回収試験

小麦, 稲わら及び WCRS について, イミダクロプリドとして, 小麦に 0.005 及び 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.005 及び 0.2 µg/mL), 稲わらに 0.2 及び 10 mg/kg 相当量 (前者のうち, 未希釈溶液を液液分配に供したものにあっては, 最終試料溶液中で 0.05 µg/mL. 10 倍に希釈した溶液を液液分配に供したものにあっては, 最終試料溶液中で 0.005 µg/mL. 後者は最終試料溶液中で 0.125 µg/mL. ), WCRS に原物換算して 0.09 及び 3 mg/kg 相当量 (前者のうち, 未希釈溶液を液液分配に供したものにあっては, 最終試料溶液中で 0.05 µg/mL. 10 倍に希釈した溶液を液液分配に供したものにあっては, 最終試料溶液中で 0.005 µg/mL. 後者は最終試料溶液中で 0.0875 µg/mL. ) になるようにそれぞれ添加後よく混合し, 一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し, 平均回収率及び繰返し精度を求めた.

なお, WCRS に対する添加は風乾物試料にイミダクロプリドとして 0.2 及び 7 mg/kg 相当量になるよう行い, 原物中濃度への換算は, 原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と仮定して, 原物 (水分含有量 60 %) 中濃度 = 風乾物 (水分含有量 10 %) 中濃度 / 2.25 の式により行った.

その結果 (稲わら及び WCRS については 10 倍に希釈した溶液を液液分配に供した結果. ) は Table 3 のとおり, 平均回収率は 69.1~87.9 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub>) として

3.8 %以下の成績が得られた。小麦及び WCRS（希釈溶液を液液分配に供した場合）については、妥当性確認法ガイドラインに規定された真度及び併行精度の目標値を満たしていた。稲わら及び WCRS のうち、未希釈溶液を液液分配に供した場合は、いずれも低回収となった。今回の結果から、稲わら及び WCRS についてはイミダクロプリド含量にかかわらず希釈操作が必須であることが示唆された。また、10 mg/kg 相当量のイミダクロプリドを添加した稲わらでは、希釈操作を行っても平均回収率が 70 %を下回り、低回収の傾向が見られたため、分析法の改良が必要であると考えられた。

なお、得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 3 Recoveries for imidacloprid

Spiked level (mg/kg original matter)	Feed types					
	Wheat		Rice straw		WCRS <sup>c)</sup>	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
0.01	87.9	3.3	—	—	—	—
0.09 <sup>d)</sup>	—	—	—	—	68.3	2.4
0.09 <sup>d),e)</sup>	—	—	—	—	70.8	2.1
0.2	71.1	2.5	53.1	1.0	—	—
0.2 <sup>e)</sup>	—	—	74.9	3.8	—	—
3 <sup>d)</sup>	—	—	—	—	73.3	1.9
10	—	—	69.1	1.7	—	—

—: Not tested

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Imidacloprid was spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction.

d) The spiked levels were 0.2 and 7 mg/kg air-dry matter. The levels of imidacloprid in original matter were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

The levels of imidacloprid in original matter (moisture 60 %)

= the levels of imidacloprid in air-dry matter (moisture 10 %) / 2.25

e) Sample solution was diluted 10-fold with acetonitrile before liquid-liquid extraction.

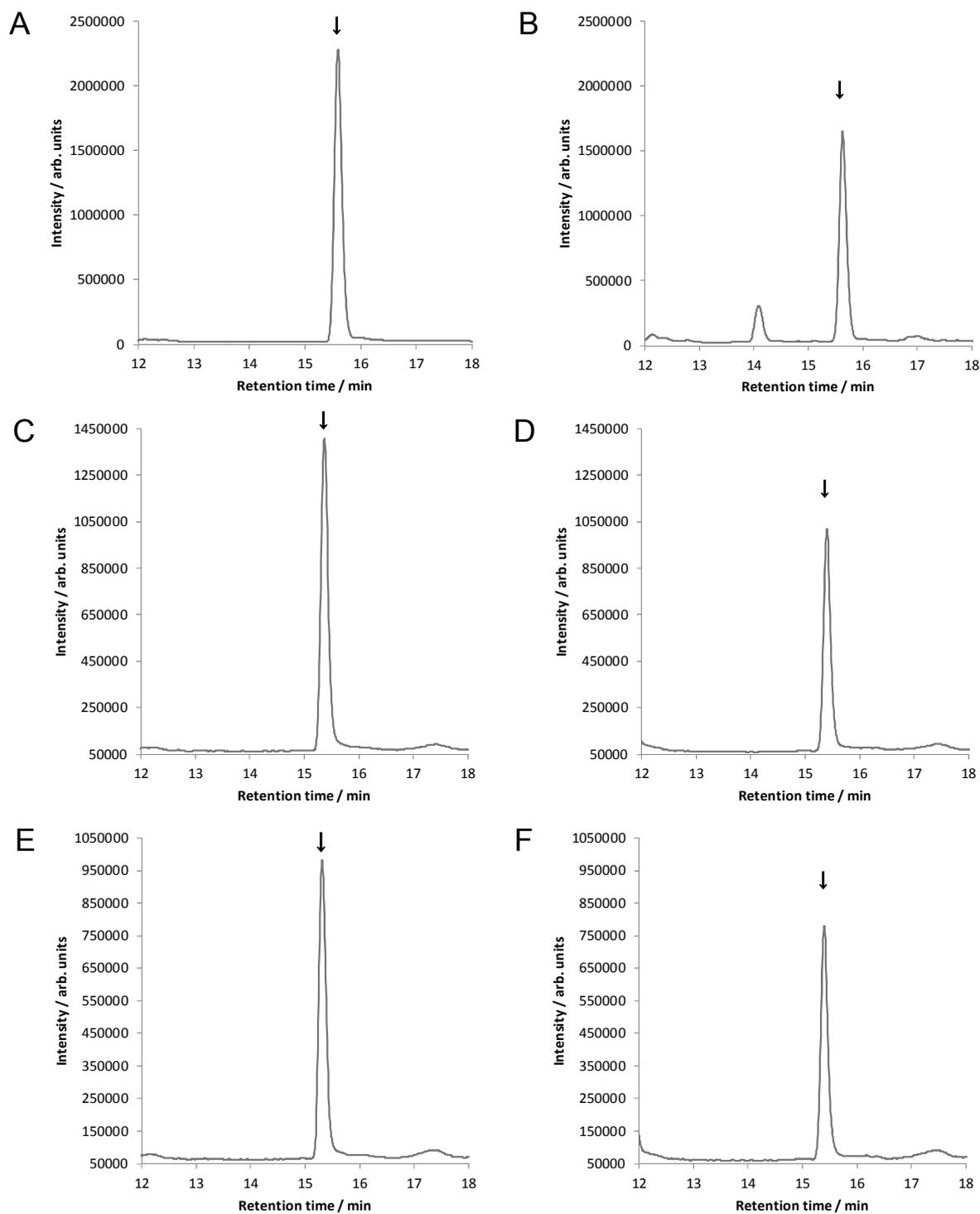


Fig. 3 SIM chromatograms of standard solutions and spiked samples (LC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate peaks of imidacloprid.)  
 A, C and E: Standard solutions (Each concentration of imidacloprid is A: 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , C: 0.12  $\mu\text{g/mL}$  and E: 0.08  $\mu\text{g/mL}$ .)  
 B, D and F: Sample solutions (B: wheat spiked at 0.2 mg/kg of imidacloprid (corresponding to 0.2  $\mu\text{g/mL}$ ), D: rice straw spiked at 10 mg/kg of imidacloprid (corresponding to 0.125  $\mu\text{g/mL}$ ) and F: WCRS spiked at 3 mg/kg original matter of imidacloprid (corresponding to 0.0875  $\mu\text{g/mL}$ ))

### 3.4 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、小麦 1 検体、稲わら 1 検体及び WCRS 1 検体にイミダクロプリドを添加し、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。なお、ノイズの計算方法は JIS K 0136:2015 に従った。また、稲わら及び WCRS については 10 倍希釈溶液を液液分配に供したのものに対して適用した。

その結果、小麦、稲わら及び WCRS（風乾物）において SN 比が 10 となる濃度は、0.14 mg/kg、0.42 mg/kg 及び 0.29 mg/kg であった。また、SN 比が 3 となる濃度は、0.04 mg/kg、0.13 mg/kg 及び 0.09 mg/kg であった。小麦については、飼料分析基準に定められた定量下限（0.005 mg/kg）及び検出下限（0.002 mg/kg）を満たさないものであった。また、稲わら及び WCRS についても、乾牧草の定量下限（0.2 mg/kg）及び検出下限（0.05 mg/kg）と比較して大きい値であった。これは、Fig. 2 に示しているとおおり、イミダクロプリドのピーク前後において他の妨害物質が多数存在することから、ノイズの計算においてこれらのピークの影響を除外することができなかったことに起因すると考えられた。そのため、イミダクロプリド以外のピークに左右されない方法として、定量値の標準偏差の 10 倍及び 4.26 倍（自由度 4 の  $t$  分布の 0.95 分位点の 2 倍）を定量下限及び検出下限として採用することとした。その結果、定量下限の実測値は、小麦、稲わら及び WCRS についてそれぞれ、0.002 mg/kg、0.08 mg/kg 及び 0.04 mg/kg、検出下限の実測値は 0.0007 mg/kg、0.03 mg/kg 及び 0.02 mg/kg であり、いずれも飼料分析基準に示された値を下回ったため、当該分析法の定量下限及び検出下限については変更しないこととした。

なお、Table 3 に示したとおおり、飼料分析基準に定められた定量下限濃度（稲わら及び WCRS にあっては、乾牧草の定量下限濃度）における添加回収試験結果は良好であった。

## 4 まとめ

小麦、稲わら及び WCRS に残留するイミダクロプリドについて、飼料分析基準に記載されている分析法の妥当性を確認したところ、小麦及び WCRS については妥当性確認法ガイドラインの目標を満たし、分析法の妥当性が確認されたが、稲わらにおいて回収率が 70 %を下回り、分析法の改良が必要であった。また、飼料分析基準では、飼料中のイミダクロプリド含量が多い場合にのみ抽出溶液を希釈することとしているが、稲わら及び WCRS についてはイミダクロプリド含量にかかわらず希釈操作が必須であることが示唆された。

## 文 献

- 1) 野崎 友春, 山多 利秋：飼料中のイミダクロプリドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法, 飼料研究報告, 32, 23-29 (2007).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について, 昭和 63 年 10 月 14 日付け 63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成 18 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業（飼料中の有害物質等の分析法の開発） (2007).

**技術レポート**

## 4 農薬のガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法の妥当性確認 ～ブロモブチド代謝物への適用～

榑原 良成\*, 若宮 洋市\*

### Validation Study on Analyte Expansion to the Simultaneous Determination Method of Pesticides in Feed by GC-MS for Debromo Metabolite of Bromobutide

Yoshinari SAKAKIBARA\* and Youichi WAKAMIYA\*

(\* Fukuoka Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

An analyte expansion to the simultaneous analysis method of pesticides in feed using a gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS), which had been listed in analytical standards of feeds, was studied for debromo metabolite of bromobutide (deBr-bromobutide).

After adding water to the sample, deBr-bromobutide was extracted with acetonitrile and the extracted solution was filtered. The filtrate was purified with a SPE column (Chem Elut, 20 mL, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA), gel permeation chromatography (GPC) and two other types of SPE columns (ENVI-Carb/LC-NH, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA and Sep-Pak Plus Silica cartridge, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into the GC-MS to determine the level of deBr-bromobutide. The GC separation was carried out on a fused silica capillary column (DB-5MS, 0.25 mm i.d. × 30 m, film thickness 0.25 μm from Agilent Technologies Inc.). The mass spectrometer was operated in electron ionization (EI) mode.

Spike tests were conducted on formula feed for layer, corn, Sudan grass hay, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS). DeBr-bromobutide was spiked at the levels of 0.05 and 0.5 mg/kg for formula feed for layer, corn and Sudan grass hay, 0.05 and 1.5 mg/kg for rice straw, 0.02 and 0.4 mg/kg air-dry matter for WCRS, respectively. The mean recoveries of deBr-bromobutide ranged from 87.6 % to 154 %, and the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>) were not more than 11 %.

A collaborative study was conducted in six laboratories using formula feed for layer and corn spiked with 1.0 mg/kg, rice straw spiked with 1.5 mg/kg of deBr-bromobutide, respectively. The mean recovery, RSD<sub>r</sub>, the reproducibility in terms of relative standard deviations RSD<sub>R</sub> and HorRat, respectively, were 107 %, 8.7 %, 12 % and 0.77 for formula feed for layer, 113 %, 7.5 %, 13 % and 0.84 for corn, and 129 %, 7.9 %, 10 % and 0.66 for rice straw.

The simultaneous analysis method of pesticides in feed was validated for analysis of deBr-bromobutide in feed.

Key words: feed; bromobutide; debromo metabolite of bromobutide; gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS); electron ionization (EI); collaborative study

キーワード：飼料；ブロモブチド；ブロモブチド代謝物（脱臭素体）；ガスクロマトグラフ質量分析計；電子イオン化法；共同試験

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

## 1 緒 言

ブロモブチドは、アミド系除草剤であり、植物の細胞分裂の阻害によって根部あるいは茎葉部の伸長を阻害し、雑草を枯死させるものと考えられている<sup>1)</sup>。日本国内では水稲に対して適用があり、米及び魚介類について食品衛生法に基づく残留基準値が設定されている。この基準値は、農産物（米）については、ブロモブチド及び *N*-( $\alpha,\alpha$ -ジメチルベンジル)-3,3-ジメチルブチルアミド（以下「deBr-ブロモブチド」いう。）をブロモブチド含量に換算した和とされている<sup>2)</sup>。

一方、飼料中のブロモブチドについては、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準<sup>3)</sup>において、稲わら中で 2 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）中で 0.5 mg/kg の管理基準値が規定されている。

飼料中のブロモブチドの定量法として、飼料分析基準<sup>4)</sup>に農薬のガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）による一斉分析法（以下「本法」という。）が規定されている。しかしながら、合わせて定量する必要のある deBr-ブロモブチドの分析法が飼料分析基準に記載されていないことから、分析法の確立が急務となっている。

今回、本法の分析対象化合物に deBr-ブロモブチドを追加するための妥当性確認を行ったのでその概要を報告する。

参考にブロモブチド及び deBr-ブロモブチドの化学構造式等を Fig. 1 に示した。

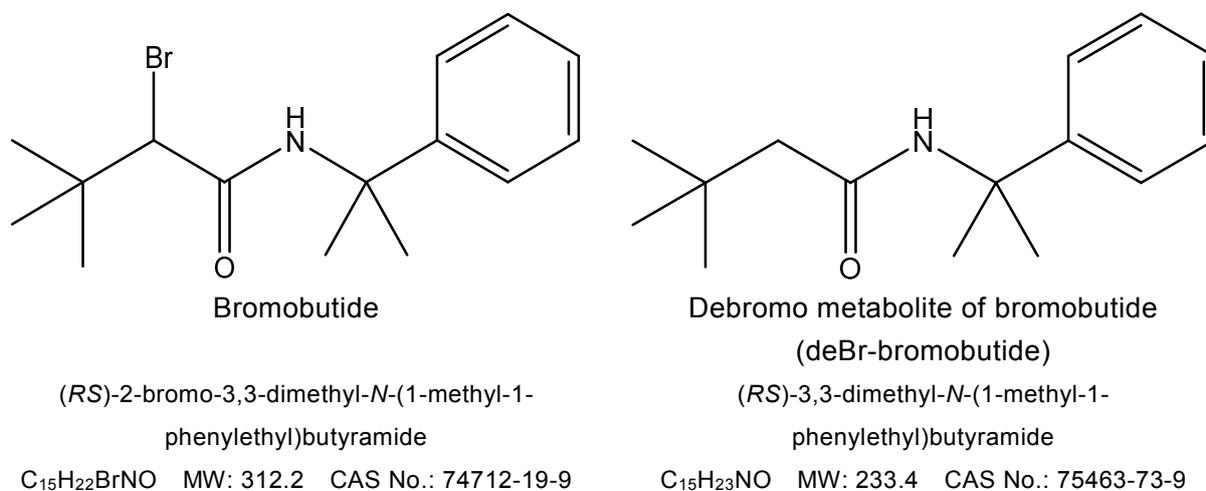


Fig. 1 Chemical structures of bromobutide and deBr-bromobutide

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

配合飼料（ブロイラー肥育後期用、肉豚肥育用及び肉用牛肥育用）、とうもろこし、大麦、小麦、マイロ、乾牧草（アルファルファ乾草及びスーダングラス乾草）、稲わら及び粃米はそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。WCRS は 60 °C で 6 時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉碎した。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For finishing broiler	Grains	63	Corn, polished rice
	Oil seed meal	27	Soybean meal, rapeseed meal
	Animal by-products	1	Meat and bone meal (derived from pork and chicken), poultry by-product meal
	Others	9	Animal fat, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, feed additives
For fattening pigs	Grains	83	Corn, wheat, polished rice, brown rice, milo
	Oil seed meal	15	Soybean meal
	Others	2	Calcium carbonate, calcium phosphate, animal fat, salt, feed additives
For beef cattle	Grains	43	Milo, corn
	Brans	36	Wheat bran
	Oil seed meal	16	Rapeseed meal, soybean meal
	Others	5	Calcium carbonate, molasses, salt, feed additives

## 2.2 試薬

1) アセトニトリル, 酢酸エチル, ヘキサン, アセトン, シクロヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた. 2,2,4-トリメチルペンタンは液体クロマトグラフ用を用いた. ジエチレングリコールは鹿 1 級 (99.0 %以上, 関東化学製) を用いた. 水は RFU354BA (東洋製作所製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた.

### 2) deBr-ブロモブチド標準原液

deBr-ブロモブチド標準品 (純度 98.0 %, 和光純薬工業製) 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, アセトンを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて deBr-ブロモブチド標準原液を調製した (この液 1 mL は, deBr-ブロモブチドとして 0.5 mg を含有する. ).

### 3) deBr-ブロモブチド標準原液

使用に際して, deBr-ブロモブチド標準原液 5 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ, 更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) を加えて, 1 mL 中に deBr-ブロモブチドとして 50 µg を含有する液を調製した. この液の一定量を, 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に deBr-ブロモブチドとして 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5 µg を含有する標準液を調製した.

## 2.3 装置及び器具

### 1) 粉砕機 :

粉砕機 1 (粉砕機 2 以外の試料用) : ZM-200 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)

粉砕機 2 (稲わら及び WCRS 用) : SM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

### 2) 振とう機 : レシプロシェーカー SR-2W タイテック製 (使用時振とう数 280 rpm)

### 3) 遠心分離器 : テーブルトップ遠心機 4000 久保田製作所製

- 4) 多孔性ケイソウ土カラム (20 mL 保持用) : Chem Elut, 20 mL Agilent Technologies 製
- 5) グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム : ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (500 mg/500 mg) Sigma-Aldrich 製
- 6) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム : Sep-Pak Plus Florisil cartridge (充てん剤量 910 mg) Waters 製にリザーバーを連結したもの
- 7) メンブランフィルター : DISMIC-25HP (孔径 0.45  $\mu$ m, 直径 25 mm, PTFE) 東洋濾紙製
- 8) ゲル浸透クロマトグラフ : GPC システム 日本分光製
- 9) GC-MS :
  - GC 部 : 7890A Agilent Technologies 製
  - MS 部 : 5975C Agilent Technologies 製

## 2.4 定量方法

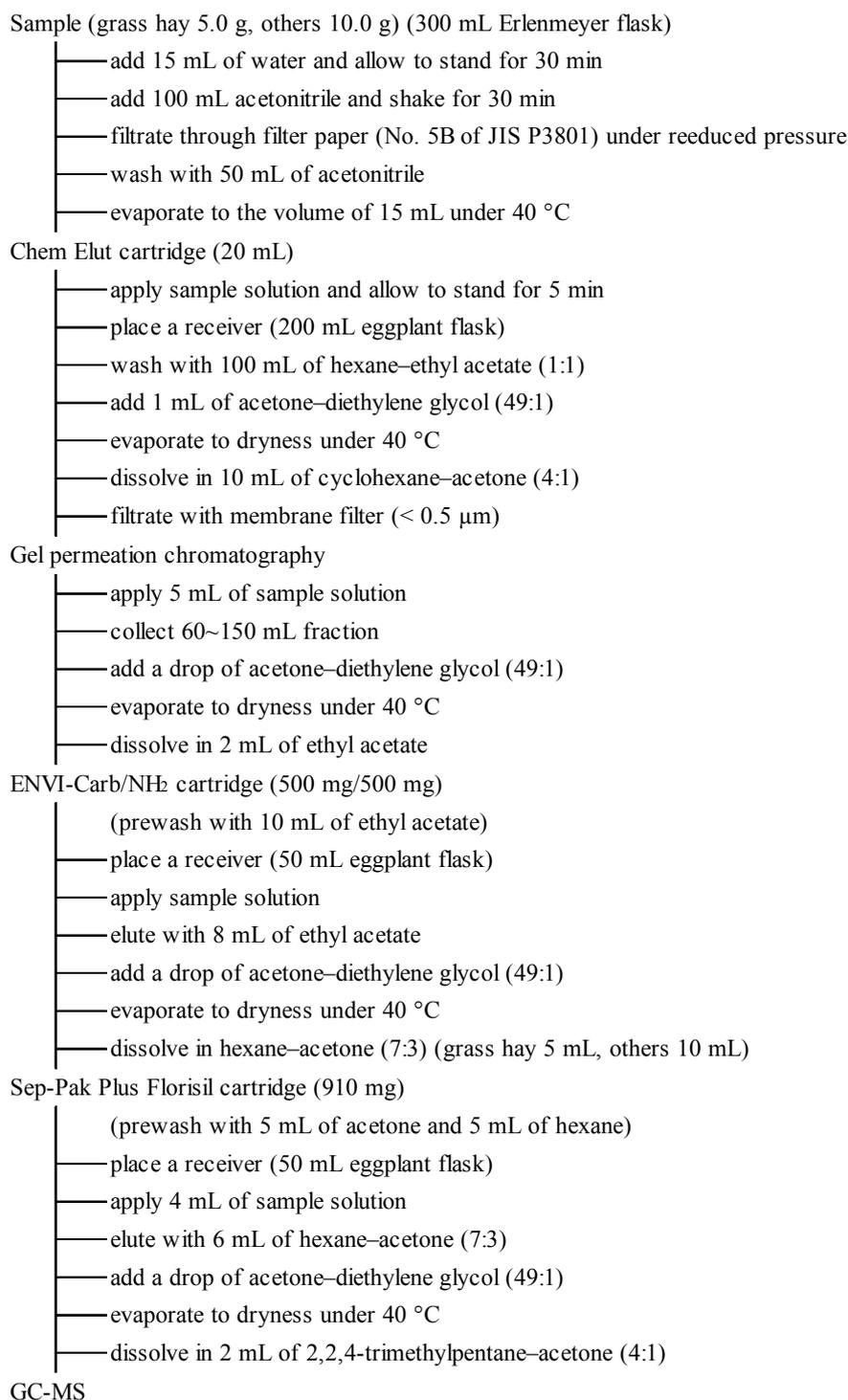
飼料分析基準第 6 章第 3 節 1 農薬のガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法に従って定量した。GC-MS におけるモニターイオンは、定量イオンは  $m/z$  119, 確認イオンは  $m/z$  233 とした。ゲル浸透クロマトグラフ及び GC-MS の測定条件を Table 2 及び Table 3 に示した。

**Table 2** Operating conditions of gel permeation chromatography (GPC)

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d.×300 mm, 15 $\mu$ m), Showa Denko
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d.×100 mm, 15 $\mu$ m), Showa Denko
Eluent	Cyclohexane-acetone (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	60~150 mL

**Table 3** Operating conditions of gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS)

Column	DB-5MS+DG (0.25 mm i.d ×30 m+10 m guard column, 0.25 $\mu$ m film thickness), Agilent Technologies
Column temperature	70 °C (hold for 1 min) → ramp 25 °C/min → 150 °C → ramp 3 °C/min → 200 °C → ramp 8 °C/min → 280 °C (hold for 10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection port temperature	280 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temperature	250 °C
Ion source temperature	230 °C
Ionization	Electron ionization (EI)
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	$m/z$ 119 (for quantification), 233 (for confirmation)



Scheme 1 Analytical procedure for simultaneous determination of pesticides in feeds by GC-MS

### 3 結果及び考察

#### 3.1 モニターイオンの設定

deBr-ブromobチドのマススペクトル (Fig. 2) より, 定量イオンには  $m/z$  119 (2-フェニルプロピルラジカルカチオンと推察された.) を, 確認イオンには  $m/z$  233 (分子イオン) をそれぞれ

設定した。

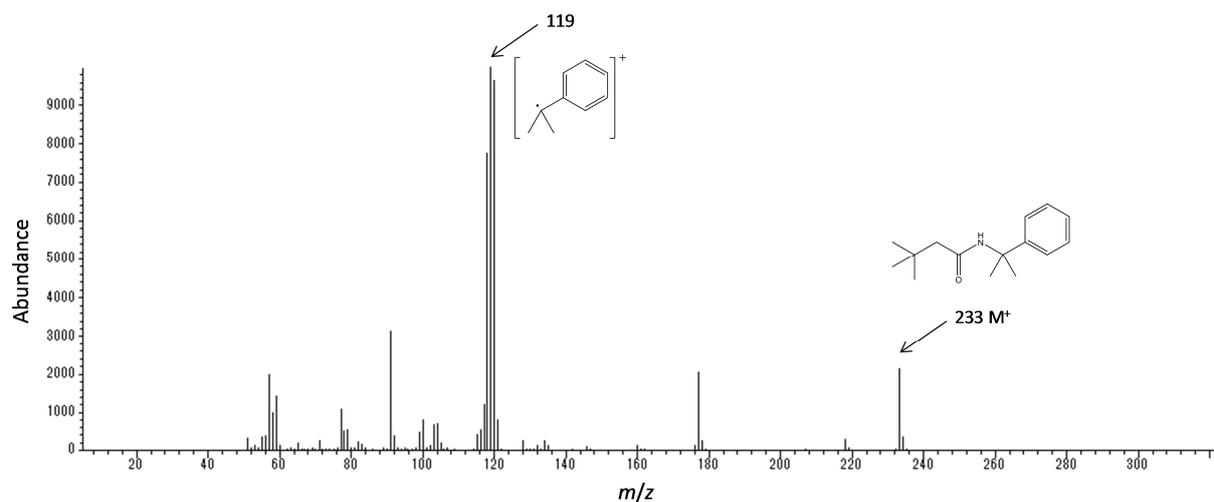


Fig. 2 Mass spectrum of deBr-bromobutide

### 3.2 検量線

2.2 の 3)に従って調製した deBr-ブロモブチド標準液各 1  $\mu\text{L}$  を GC-MS に注入し、得られた選択イオン検出（以下「SIM」という。）クロマトグラムからピーク高さを用いて検量線を作成した。得られた検量線の一例は、Fig. 3 のとおりであり、deBr-ブロモブチドは 0.02~0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （注入量として 0.02~0.5 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、deBr-ブロモブチドを 0.02~0.5 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の deBr-ブロモブチド濃度範囲に相当する。

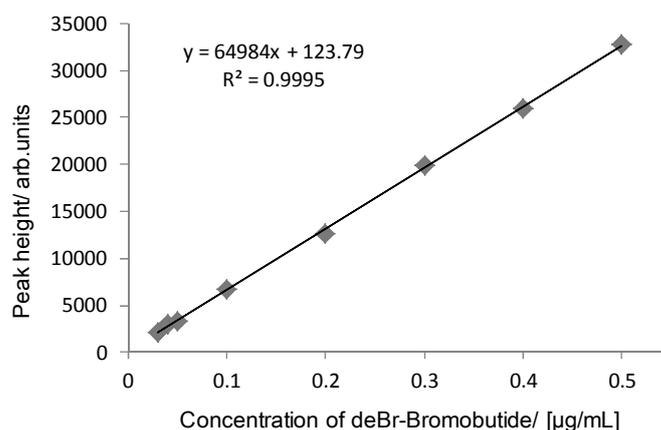


Fig. 3 Calibration curve of deBr-bromobutide by peak height

### 3.3 妨害物質の検討

配合飼料（ブロイラー肥育後期用，肉豚肥育用及び肉用牛肥育用），大麦，小麦，とうもろこし，マイロ，乾牧草（アルファルファ乾草及びスーダングラス乾草），稲わら，WCRS 及び粃米各 1 検体を試料として，本法により調製した試料溶液を GC-MS に注入し，得られた SIM クロマトグラムを確認したところ，いずれの試料においても deBr-ブロモブチドの定量を妨げるピーク

クは認められなかった。

なお、得られたSIMクロマトグラムの一例を Fig.4 に示した。

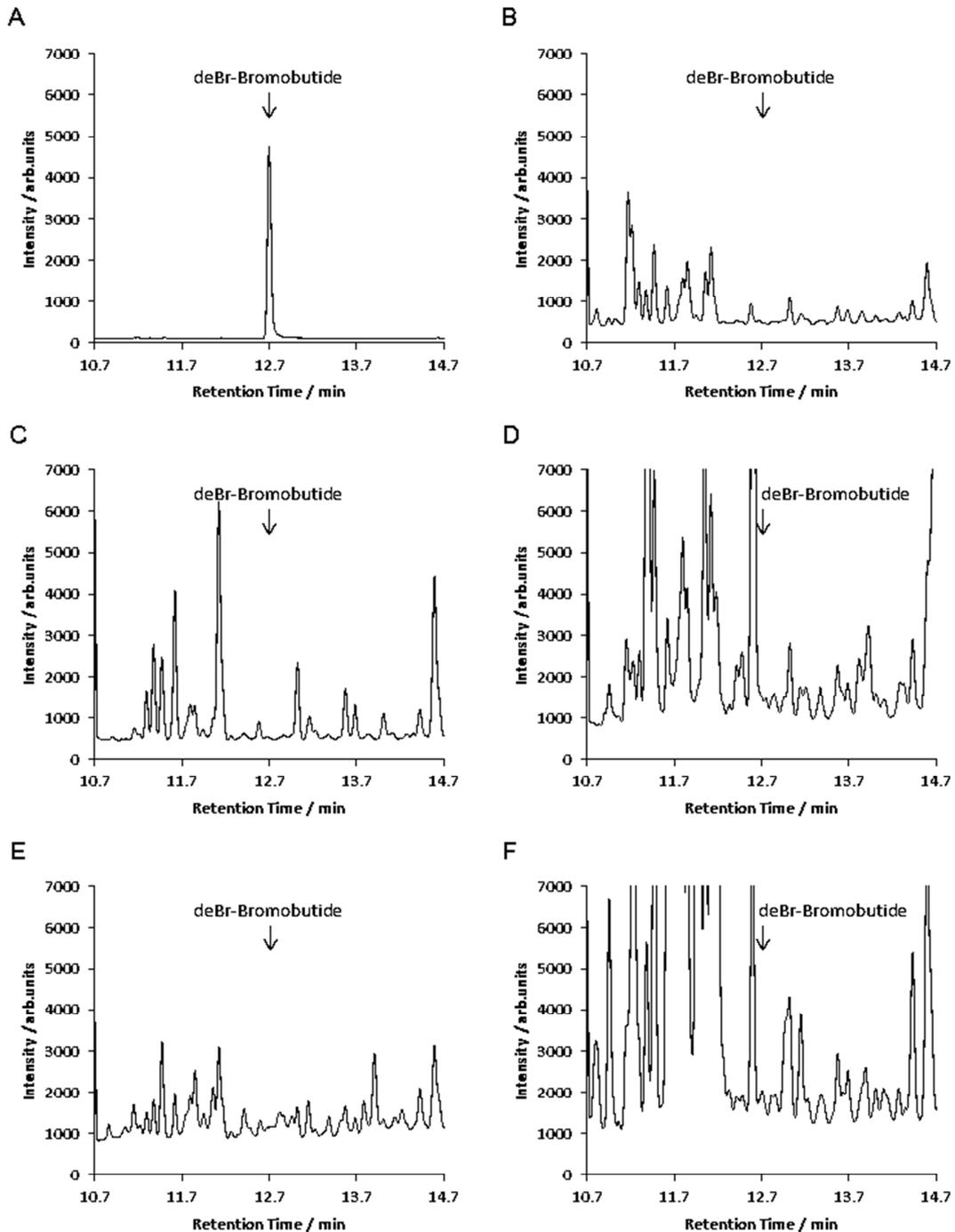


Fig. 4 Selected ion monitoring chromatograms of standard solution and sample solutions (blank) (GC-MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention time of deBr-bromobutide.)

A: Standard solution (0.05  $\mu\text{g/mL}$ : 0.05 ng as deBr-bromobutide)

B~F: Blank samples (B: formula feed for layer, C: corn, D: Sudangrass hay, E: rice straw, F: whole-crop rice silage (WCRS))

### 3.4 マトリックス効果の確認

本法により調製したブロイラー肥育後期用配合飼料，とうもろこし，スーダングラス乾草，稲わら及び WCRS のブランク試料溶液に deBr-プロモブチドとして 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.5 µg/mL 相当量）をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について，同濃度の deBr-プロモブチド標準液に対するピーク高さ比を確認したところ，ピーク高さ比は Table 4 のとおり 112~164 % であり，試料マトリックスによるイオン化促進がみられた．なお，試料マトリックスによるピーク形状の変化は認められなかった．

Table 4 Matrix effect of feeds

Feed types of matrix	Concentration of deBr-bromobutide		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)
	in matrix standard solution (µg/mL)	in sample <sup>a)</sup> (mg/kg)	
Formula feed for layer	0.5	0.5	145
Corn	0.5	0.5	156
Sudangrass hay	0.5	0.5	112
Rice straw	0.5	0.5	164
WCRS	0.5	0.5 <sup>c)</sup>	133

$n = 1$

a) Converted from the concentration in the matrix standard solution

b) Ratio of peak height of deBr-bromobutide in the presence of matrix to that in the absence of matrix

c) mg/kg air-dry matter

### 3.5 添加回収試験

2.2 の 2) の deBr-プロモブチド標準原液を 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し添加に用いた．

deBr-プロモブチドについて，ブロイラー肥育後期用配合飼料，とうもろこし及びスーダングラス乾草にそれぞれ 0.05 及び 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.05 及び 0.10 µg/mL になるよう希釈），稲わらに 0.05 及び 1.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.05 及び 0.15 µg/mL になるよう希釈），WCRS に原物換算して 0.02 及び 0.4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.05 及び 0.10 µg/mL になるよう希釈）になるようにそれぞれ添加後よく混合し，一夜静置した後に本法に従って定量し，平均回収率及び繰返し精度を求めた．

なお，WCRS に対する添加は風乾物試料に deBr-プロモブチドとして 0.05 及び 1 mg/kg 相当量になるよう行い，原物中濃度への換算は，原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と仮定して，原物（水分含有量 60 %）中濃度 = 風乾物（水分含有量 10 %）中濃度 / 2.25 の式により行った．

その結果は Table 5 のとおり，平均回収率は 87.6~154 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub>) として 11 % 以下の成績が得られ，本法が策定された当時目安としていた回収率及び繰返し精度の範囲（それぞれ 50~200 % 及び 20 % 以下）内であった．

なお，得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した．

Table 5 Recoveries for deBr-Bromobutide

Spiked level (mg/kg original matter)	Feed types									
	Formula feed for layer		Corn		Sudangrass hay		Rice straw		WCRS <sup>c)</sup>	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)								
0.02 <sup>d)</sup>	—	—	—	—	—	—	—	—	135	2.6
0.05	131	7.7	142	4.1	114	8.1	154	11	—	—
0.4 <sup>d)</sup>	—	—	—	—	—	—	—	—	121	3.8
0.5	87.6	8.8	121	2.6	99.2	8.9	—	—	—	—
1.5	—	—	—	—	—	—	124	8.1	—	—

— : Not tested

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

c) deBr-bromobutide was spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction.

d) The spiked levels were 0.05 and 1 mg/kg air-dry matter. The levels of deBr-bromobutide in original matter were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

The levels of deBr-bromobutide in original matter (moisture 60 %)

= the levels of deBr-bromobutide in air-dry matter (moisture 10 %) / 2.25

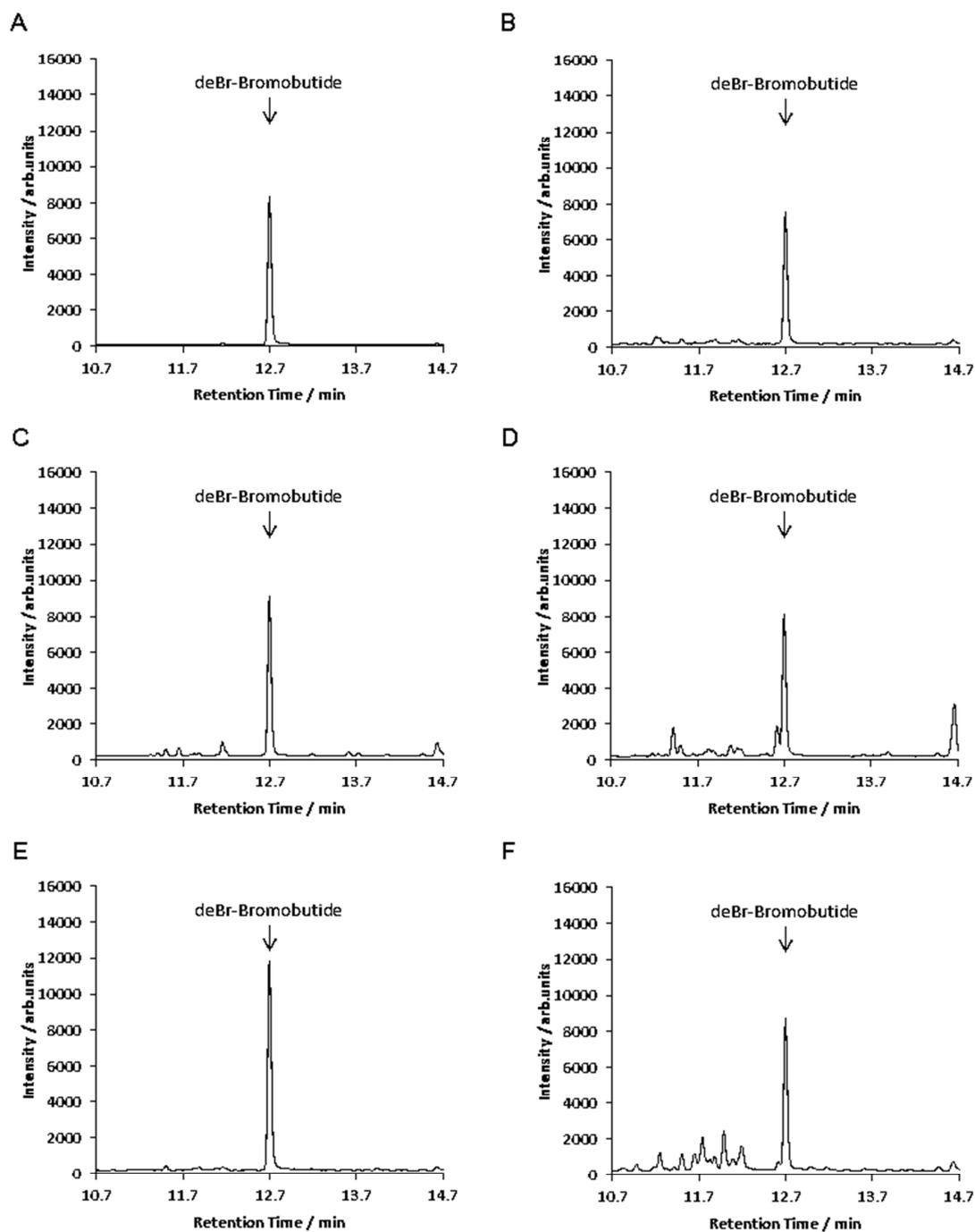


Fig. 5 Selected ion monitoring chromatograms of standard solution and spiked samples (GC-MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peak of deBr-bromobutide.)  
A: Standard solution of deBr-bromobutide (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 0.1 ng as deBr-bromobutide)  
B: Formula feed for layer spiked at 0.5 mg/kg of deBr-bromobutide (0.1 ng as deBr-bromobutide)  
C: Corn spiked at 0.5 mg/kg of deBr-bromobutide (0.1 ng as deBr-bromobutide)  
D: Sudangrass hay spiked at 0.5 mg/kg of deBr-bromobutide (0.1 ng as deBr-bromobutide)  
E: Rice straw spiked at 1.5 mg/kg of deBr-bromobutide (0.15 ng as deBr-bromobutide)  
F: WCRS spiked at 0.4 mg/kg of deBr-bromobutide (0.1 ng as deBr-bromobutide)

### 3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、ブロイラー肥育後期用配合飼料、とうもろこし及び稲わらに deBr-ブロモブチドを添加し、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

WCRS 及びスーダングラス乾草については、ピーク前方に大きなノイズがあることから標準偏差の 10 倍及び 4.26 倍（自由度 4 の  $t$  分布の 0.95 分位点の 2 倍）を定量下限及び検出下限として計算した。

その結果、SN 比が 10 及び 3 となる濃度は、0.05 mg/kg 及び 0.02 mg/kg であり、WCRS 及びスーダングラス乾草の計算結果もこの値を満たしていたことから、ブロモブチドと同様、試料（WCRS は風乾物）中の定量下限は 0.05 mg/kg、検出下限は 0.02 mg/kg とした。設定した定量下限及び検出下限濃度は、ブロモブチドの管理基準の最小濃度を deBr-ブロモブチドに換算した濃度 0.8 mg/kg に対して 1/16 及び 1/40 であり、飼料分析基準の妥当性確認法ガイドライン<sup>4)</sup>（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた目標を満たしていた。

なお、Table 5 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった。

### 3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、ブロイラー肥育後期用配合飼料及びとうもろこしに deBr-ブロモブチドとして 1 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 10  $\mu$ g を含有する標準液 1 mL）、稲わらには 1.5 mg/kg 相当量（分析用試料 5 g に対して 1 mL 中に 7.5  $\mu$ g を含有する標準液 1 mL）を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた。参加試験室は、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センター（計 6 試験室）であった。

結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>5), 6)</sup>を参考に、Cochran 検定、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行い、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度 ( $RSD_r$ ) 及び室間再現精度 ( $RSD_R$ ) を算出し、得られた  $RSD_R$  から、修正 Horwitz 式<sup>7)</sup>を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 6 のとおりである。ブロイラー肥育後期用配合飼料、とうもろこし及び稲わらについて、deBr-ブロモブチドの平均回収率は 107, 113 及び 129 %,  $RSD_r$  は 8.7, 7.5 及び 7.9 %,  $RSD_R$  は 12, 13 及び 10 %, HorRat は 0.77, 0.84 及び 0.66 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標を満たしていた。

参考のため、各試験室で使用したガスクロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 7 に示した。

Table 6 Collaborative study for deBr-bromobutide

Lab. No.	Feed types					
	Formula feed for layer (mg/kg)		Corn (mg/kg)		Rice straw (mg/kg)	
1	1.22	1.10	1.24	1.19	1.72	1.96
2	0.966	1.12	0.966	1.04	2.03	2.27
3	1.16	1.16	1.26	1.27	1.82	1.99
4	1.11	1.02	1.16	1.28	1.95	2.25
5	1.01	1.25	1.02	1.26	1.76	1.98
6	0.882	0.848	0.957	0.885	1.77	1.79
Spiked level (mg/kg)	1		1		1.5	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	1.07		1.13		1.94	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	107		113		129	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	8.7		7.5		7.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	12		13		10	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	16		16		14	
HorRat	0.77		0.84		0.66	

a)  $n = 12$ 

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 7 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	GC-MS	GC column (i.d. × length, film thickness)
1	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-5MS+DG, Agilent Technologies (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm, Duraguard 10 m)
2	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-5MS+DG, Agilent Technologies (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm, Duraguard 10 m)
3	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
4	GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
5	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-5MS, Agilent Technologies (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)
6	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm)

#### 4 まとめ

飼料中の deBr-プロモブチドについて、飼料分析基準に記載の農薬の GC-MS による一斉分析法を基に、妥当性を確認したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

1) 検量線は、0.02~0.5 μg/mL (注入量として 0.02~0.5 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、deBr-ブロモブチドを 0.02~0.5 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の deBr-ブロモブチド濃度範囲に相当する。

- 2) 本法に従って得られた SIM クロマトグラムでは、3 種類の配合飼料及び 9 種類の飼料原料において定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、deBr-ブロモブチドは試料マトリックスによるイオン化促進がみられた。
- 4) ブロイラー肥育後期用配合飼料、とうもろこし及びスーダングラス乾草にそれぞれ 0.05 mg/kg 及び 0.5 mg/kg 相当量、稲わらに 0.05 mg/kg 及び 1.5 mg/kg 相当量、WCRS に 0.02 mg/kg 及び 0.4 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、本法が策定された当時目安としていた回収率及び繰返し精度の範囲（それぞれ 50~200 % 及び 20 % 以下）内であった。
- 5) 本法の deBr-ブロモブチドの定量下限は試料（WCRS は風乾物）中で 0.05 mg/kg、検出下限は 0.02 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限濃度は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた。
- 6) ブロイラー肥育後期用配合飼料及びとうもろこしに deBr-ブロモブチドとして 1 mg/kg 相当量、稲わらに 1.5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 6 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標を満たしていた。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会：農薬評価書 ブロモブチド，平成 20 年 1 月 (2008)。
- 2) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959)。
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988)。
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008)。
- 5) William Horwitz: Protocol for design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995)。
- 6) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5)。
- 7) Michael Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000)。

## 技術レポート

## 5 愛玩動物用飼料等の検査法収載法のスナック製品への適用のための妥当性確認

～有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法～

鈴木 知華\*, 奥富 幸\*, 高橋 亜紀子\*

## Validation Study on Application of the Simultaneous Determination Method of Organochlorine Pesticides by GC to Snack Type Pet Food

Chika SUZUKI\*, Yuki OKUTOMI\* and Akiko TAKAHASHI\*

(\* Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

The applicability of a simultaneous determination method of organochlorine pesticides in dry and semi-dry type pet food using a gas chromatograph equipped with an electron capture detector (GC-ECD) to snack type pet food was investigated.

Nineteen organochlorine pesticides (aldrin,  $\alpha$ -BHC,  $\beta$ -BHC,  $\gamma$ -BHC,  $\delta$ -BHC, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, dieldrin, endrin, hexachlorobenzene, heptachlor, heptachlor epoxide, *trans*-heptachlor epoxide, methoxychlor and nitrofen) were extracted by adding acetonitrile-water (3:1) and acetonitrile to sample. The extracted solution was filtered and the filtrate was purified with a SPE column (Chem Elut, 20 mL, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA), gel permeation chromatography (GPC) and a SPE column (Sep-Pak Plus Florisil cartridge, Waters Corporation; Milford, MA, USA) and injected into the GC-ECD to determine the levels of the nineteen pesticides. The GC separation was carried out on a fused silica capillary column (DB-1701, 0.25 mm i.d.  $\times$  30 m, film thickness 0.25  $\mu$ m from Agilent Technologies Inc.).

Spike tests were conducted on formed jerky, dried jerky (both hard and soft), biscuit and milk powder spiked with 0.002 or 0.1 mg/kg of six DDT related compounds, 0.01 or 0.05 mg/kg of methoxychlor and 0.002 or 0.01 mg/kg of other twelve compounds. Recoveries ranged from 81.0 to 118 % for formed jerky, dried jerky and biscuit, and relative standard deviations of repeatability (RSD<sub>r</sub>) were not more than 11 %. Meanwhile, recoveries ranged from 46.8 to 170 % and RSD<sub>r</sub> were not more than 15 % for milk powder.

This method was validated for analysis of organochlorine pesticides in snack type pet food except for milk powder.

Key words: organochlorine pesticides; gas chromatograph equipped with electron capture detector (GC-ECD); gel permeation chromatography (GPC); snack type pet food

キーワード：有機塩素系農薬；電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフ；ゲル浸透クロマトグラフィー；愛玩動物用飼料（スナック製品）

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

## 1 緒 言

独立行政法人農林水産消費安全技術センターが定める「愛玩動物用飼料等の検査法」<sup>1)</sup>（以下「検査法」という。）に記載する分析法については、従来、流通量及び摂食量の多い、ドライ、セミドライ及びウェット製品といった総合栄養食等、主に主食として用いられるものを先行して整備を進めてきた。しかしながら、平成 25 年 10 月、米国 FDA が、中国産ジャーキーに起因すると推測される犬猫への原因不明の健康被害が発生していると公表した<sup>2)</sup>ことを受け、現在では成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク（以下「スナック製品 5 分類」という。）の妥当性確認も実施している。平成 25 年度以前に検査法に記載され、スナック製品 5 分類について妥当性確認を行っていない分析法については、随時、適用範囲拡大のための妥当性確認を行っている。

平成 28 年度は、ドライ製品及びセミドライ製品を対象とする有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その 1）有機塩素系農薬 18 成分同時分析法（以下「有機塩素系農薬収載法」という。）について、スナック製品 5 分類への適用範囲拡大のための妥当性確認を行った。

今回検討した成分のうち、愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令<sup>3)</sup>において基準値が定められているものを Table 1 に示した。

Table 1 Maximum limits of organochlorine pesticides in pet food

Pesticides	Maximum limit ( $\mu\text{g/g}$ )
BHC (Total of $\alpha$ -BHC, $\beta$ -BHC, $\gamma$ -BHC and $\delta$ -BHC)	0.01
DDT (Total of $p,p'$ -DDD, $p,p'$ -DDE, $p,p'$ -DDT and $o,p'$ -DDT)	0.1
Total of aldrin and dieldrin	0.01
Endrin	0.01
Total of heptachlor and heptachlor epoxide	0.01

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

市販のスナック製品 5 分類の愛玩動物用飼料を試料に用い、それぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。ジャーキーで有姿のままでは粉砕が困難な試料は、はさみ等を用いて細断したのち粉砕した。

検討に用いた試料の分類、種類及びその原材料名を Table 2 に示した。なお、原材料名は、検討に用いた各試料に表記されていた名称に準拠した。

Table 2 Ingredients list of snack type pet foods used in this study

Classification	Type	Ingredients
Formed jerky (about 20~35 % moisture content)	Formed jerky (for dogs)	Chicken white meat, white fish, corn starch, non-glutinous rice, wheat flour, powdered mashed potato, salt, vegetable oil (contain soybean oil and canola oil), powdered starch syrup, collagen peptide (salmon), wheat protein, glycerin, propylene glycol, pH adjuster, preservative (potassium sorbate), antioxidants (sodium erythorbate, V. E), color former (sodium nitrite)
	Formed jerky (for cats) 1	Meat (chicken, beef), soybean protein, wheat flour, fish meat, beef tallow, actinidia polygama, glycerin, thickening agent (modified starch), sorbitol, minerals (Ca, P, Na), preservative (sorbic acid, sodium dehydroacetate), seasoning, color former (sodium nitrite), sodium polyacrylate, coloring agents (caramel, food red no.106), V. E
	Formed jerky (for cats) 2	Tuna, chicken, defatted soybean, beef, starches, wheat protein, lard, yeast, salt, oligosaccharide, sorbitol, leavening agent, seasoning, minerals (Ca, P), phosphate (Na, K), sodium lactate, antioxidant (V.C), preservative (sorbic acid), vitamins (V. E, V. A), calcium lactate, color former (sodium nitrite)
	Formed jerky (for cats) 3	Chicken white meat, salt, sorbitol, glycerin, sodium phosphate, antioxidants (V. C), color former (sodium nitrite)
Dried jerky (hard, about 10~15 % moisture content)	Dried jerky (hard) (for dogs)	Chicken white meat, salt
	Dried jerky (soft) (for dogs) 1	Chicken white meat, glycerin, sodium lactate, trehalose, potassium chloride, antioxidants (V. E, sodium erythorbate), sodium phosphate, preservative (potassium sorbate)
Dried jerky (soft, about 25 % moisture content)	Dried jerky (soft) (for dogs) 2	Chicken white meat, glucosamine, fructo-oligosaccharide, glycerin, sodium lactate, trehalose, potassium chloride, antioxidants (V.E, sodium erythorbate), sodium phosphate, preservative (potassium sorbate), pH adjuster, flavoring agent, color former (sodium nitrite)
	Dried jerky (soft) (for dogs) 3	Beef tendon, salt, glycerin, propylene glycol, preservative (potassium sorbate), antioxidant (sodium erythorbate), color former (sodium nitrite)
	Dried jerky (soft) (for dogs and cats)	Cod, D-sorbitol
Confectionery	Confectionery (biscuit for dogs) 1	Wheat flour, sugar, vegetable oil, tapioca starch, vegetables (spinach, carrot, pumpkin), milk powder, chicory extracts (containing dietary fiber and oligosaccharide), leavening agent, minerals (Ca, Na), flavoring agent, yucca extracts, coloring agents (food yellow no. 4, food yellow no. 5, food blue no. 1)
	Confectionery (biscuit for dogs) 2	Wheat flour, margarine, granulated sugar, egg, rice germ and soybean fermentation extracts, trees extracts, galactooligosaccharide, whey protein concentrated powder (dairy products), non-fat dry milk, lactose, vegetable oil, sweetener (D-sorbitol), calcium carbonate, green tea extracts, antioxidants (V. E, rosemary extracts)
Milk powder	Milk powder (for dogs) 1	Dry milk (non-fat dry milk, casein), oils and fats (vegetable oil, animal fat, $\gamma$ -linolenic acid), powdered egg yolk, soybean protein, oligosaccharide, L-carnitine, minerals (Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), emulsifier, vitamins (V. A, V. B <sub>1</sub> , V. B <sub>2</sub> , V. B <sub>6</sub> , V. B <sub>12</sub> , V. D, V. E, V. K, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, choline), flavoring agent, taurine
	Milk powder (for dogs) 2	Milk protein, animal fat, non-fat dry milk, vegetable oil, powdered egg yolk, milk oligosaccharide, dry yeast, pH adjuster, emulsifier, taurine, L-arginine, L-cystine, DHA, vitamins (V. A, V. D, V. E, V. K, V. B <sub>1</sub> , V. B <sub>2</sub> , pantothenic acid, niacin, V. B <sub>6</sub> , folic acid, carotene, biotin, V.B <sub>12</sub> , V.C, choline), minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se), nucleotide, flavoring agent (milk cream)

## 2.2 試薬

- 1) アセトニトリル, 塩化ナトリウム, ヘキサン, シクロヘキサン, アセトン及びジエチルエーテルは残留農薬・PCB 試験用を用いた. 2,2,4-トリメチルペンタンは液体クロマトグラフ用を用いた. 水は Milli-Q Integral 5 (Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた.
- 2) 各農薬標準品  
各農薬標準品は, Table 3 に示した製造元, 純度の標準品を使用した.

Table 3 Pesticide standards used in this study

Name	Manufacturers	Formula	MW	CAS No.	Purity (%)
Aldrin	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	364.9	309-00-2	99.0
$\alpha$ -BHC	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	290.8	319-84-6	98.0
$\beta$ -BHC	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	290.8	319-85-7	98.4
$\gamma$ -BHC	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	290.8	58-89-9	98.6
$\delta$ -BHC	Sigma-Aldrich	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	290.8	319-86-8	99.4
<i>o,p'</i> -DDD	Sigma-Aldrich	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub>	320.0	53-19-0	99.8
<i>p,p'</i> -DDD	Sigma-Aldrich	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub>	320.0	72-54-8	99.5
<i>o,p'</i> -DDE	CHEM SERVICE	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub>	318.0	3424-82-6	99.5
<i>p,p'</i> -DDE	CHEM SERVICE	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub>	318.0	72-55-9	99.5
<i>o,p'</i> -DDT	CHEM SERVICE	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub>	354.5	789-02-6	97.8
<i>p,p'</i> -DDT	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub>	354.5	50-29-3	98.5
Dieldrin	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O	380.9	60-57-1	99.0
Endrin	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O	380.9	72-20-8	99.5
Heachlorobenzene	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	284.8	118-74-1	99.5
Heptachlor	Dr. Ehrenstorfer GmbH	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>7</sub>	373.3	76-44-8	99.0
Heptachlor epoxide	CHEM SERVICE	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>7</sub> O	389.3	1024-57-3	99.5
<i>trans</i> -Heptachlor epoxide	CHEM SERVICE	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>7</sub> O	389.3	28044-83-9	98.7
Methoxychlor	CHEM SERVICE	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>3</sub> O	345.7	72-43-5	99.3
Nitrofen	Wako Pure Chemical Industries	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	284.1	1836-75-7	99.0

## 2.3 装置及び器具

- 1) 粉砕機 :  
粉砕機 1 : ZM 200 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)  
粉砕機 2 : (粉砕機 1 による粉砕前の粗粉砕に必要な応じ使用) : GM 200 Verder Scientific 製 (使用時回転数 2000~8000 rpm)
- 2) 振とう機 : ストロングシェーカー SR-2DW タイテック 製 (使用時振とう数 300 rpm)
- 3) 多孔性ケイソウ土カラム (20 mL 保持用) : Chem Elut, 20 mL Agilent Technologies 製
- 4) ゲル浸透クロマトグラフ : GPC システム ジーエルサイエンス 製
- 5) メンブランフィルター : Millex-LH (孔径 0.45  $\mu$ m, 直径 25 mm, PTFE 製) Merck Millipore 製
- 6) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム : Sep-Pak Plus Florisil cartridge (充てん剤量 910 mg) Waters 製

- 7) 電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフ（以下「GC-ECD」という。）：GC-2010 Plus 島津製作所製
- 8) 溶融石英製キャピラリーカラム（14%シアノプロピルフェニル-86%ジメチルポリシロキサンコーティング）：DB-1701（内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ ） Agilent Technologies 製
- 9) 溶融石英製キャピラリーカラム（5%ジフェニル-95%ジメチルポリシロキサンコーティング）：DB-5（内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ ） Agilent Technologies 製

#### 2.4 定量方法

定量方法は、検査法第 6 章第 2 節 1 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その 1）に従って定量した。

ただし、ドライ製品及びセミドライ製品を対象とする有機塩素系農薬収載法の検量線は、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.01~0.2  $\mu\text{g}$  含有する数点の混合標準液を調製しているが、アルドリン、 $\alpha$ -BHC、 $\beta$ -BHC、 $\gamma$ -BHC、 $\delta$ -BHC、*o,p'*-DDD、*p,p'*-DDD、*o,p'*-DDE、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド及び *trans*-ヘプタクロルエポキシドについては、ウェット製品を対象とする検査法第 6 章第 2 節 5 有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法（その 2）（以下「ウェット製品有機塩素系農薬収載法」という。）を検査法に採用する際に、0.005~0.5  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で検量線が作成できることを確認している。ヘキサクロロベンゼン、メトキシクロール及びニトロフェンについては、ウェット製品有機塩素系農薬収載法の分析対象化合物になっていない。今回、有機塩素系農薬収載法におけるメトキシクロール以外の各農薬の定量限界相当濃度 0.005  $\mu\text{g/mL}$  を含む、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15 及び 0.2  $\mu\text{g}$  を含有する各農薬混合標準液を調製し、各農薬の検量線を作成した。

*trans*-ヘプタクロルエポキシドは、ウェット製品有機塩素系農薬収載法の分析対象化合物に含まれ、有機塩素系農薬収載法には分析対象化合物に含まれないが、参考までに検討を行った。

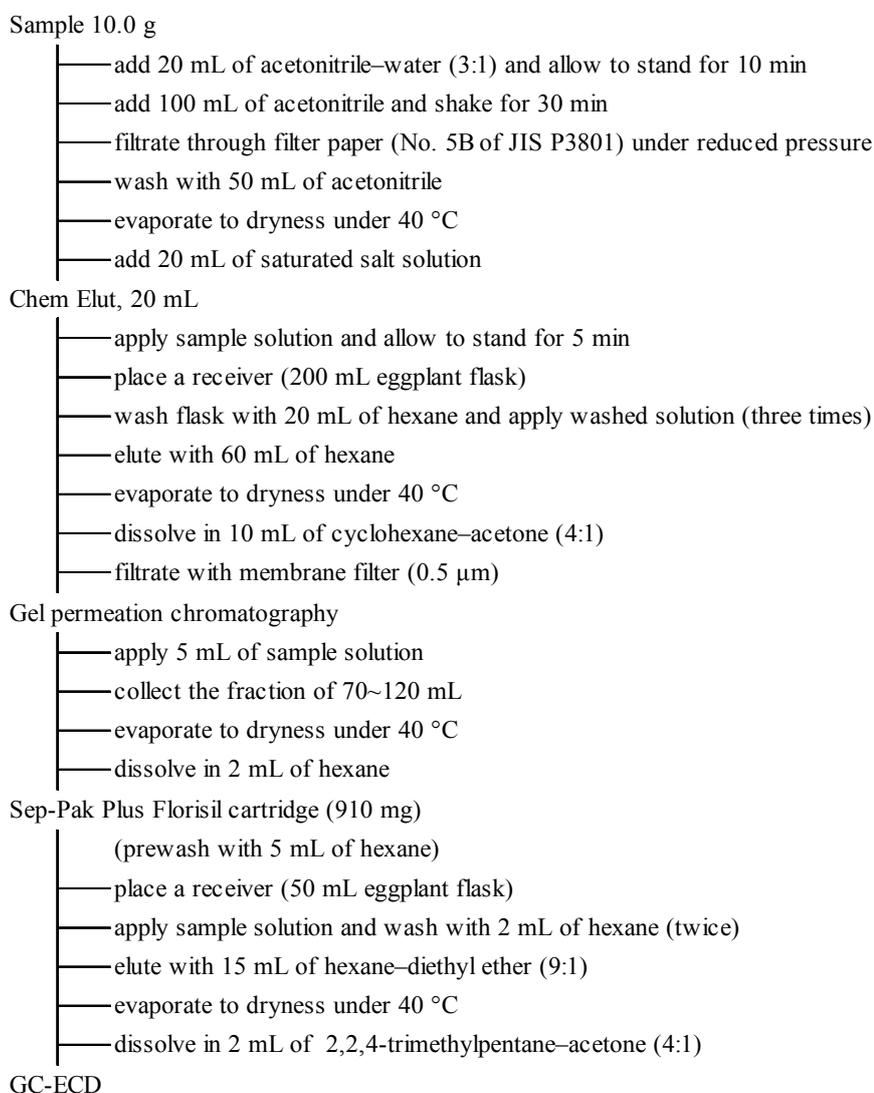
なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。また、ゲル浸透クロマトグラフの条件及び GC-ECD の測定条件を Table 4 及び Table 5 に示した。

Table 4 Operating conditions of gel permeation chromatography (GPC)

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d.×300 mm, 15 $\mu\text{m}$ ), Showa Denko
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d.×100 mm, 15 $\mu\text{m}$ ), Showa Denko
Eluent	Cyclohexane-acetone (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	70~120 mL

Table 5 Operating conditions of gas chromatograph equipped with electron capture detector (GC-ECD)

Column	DB-1701 (0.25 mm i.d ×30 m, 0.25 μm film thickness), Agilent Technologies DB-5 (0.25 mm i.d ×30 m, 0.25 μm film thickness), Agilent Technologies
Column temperature	80 °C (hold for 1 min) → ramp 20 °C/min → 180 °C → ramp 2 °C/min → 260 °C → ramp 5 °C/min → 275 °C (hold for 5 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection port temperature	280 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Detector	Electron capture detector
Detector temperature	280 °C
Injection volume	1 μL



Scheme 1 Analytical procedure for organochlorine pesticides in dry and semi-dry type pet food

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

1 mL 中にヘキサクロロベンゼン、メトキシクロール及びニトロフェンとしてそれぞれ 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15 及び 0.2  $\mu\text{g}$  を含有する各農薬混合標準液を調製し、各標準液各 1  $\mu\text{L}$  をガスクロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムからピーク高さを用いて検量線を作成した。検量線の一例は Fig. 1-1 のとおりであり、各 0.005~0.2  $\mu\text{g/mL}$  (注入量として各 0.005~0.2 ng 相当量) の範囲で決定係数 0.99 以上の直線の検量線を示したことから、検量線作成用標準液の最低濃度をウェット製品有機塩素系農薬収載法に合わせることにした。

なお、当該検量線の濃度範囲は、各農薬を 0.002~0.08 mg/kg 含有する分析用試料を有機塩素農薬収載法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する。

また、筆者らが用いた GC-ECD では低濃度範囲において傾きが変わる傾向が認められ、1 mL 中にヘキサクロロベンゼン、メトキシクロール及びニトロフェンとしてそれぞれ 0.005, 0.01, 0.015, 0.02 及び 0.025  $\mu\text{g}$  を含有する各農薬低濃度混合標準液を調製し、同様に検量線を作成した結果、Fig. 1-2 のとおり各 0.005~0.025  $\mu\text{g/mL}$  (注入量として各 0.005~0.025 ng 相当量) の範囲で決定係数 0.999 以上の直線性を示した。測定に使用する GC-ECD によっては、低濃度範囲で作成した検量線によるヘキサクロロベンゼン、メトキシクロール及びニトロフェンの算出が適すと考えた。

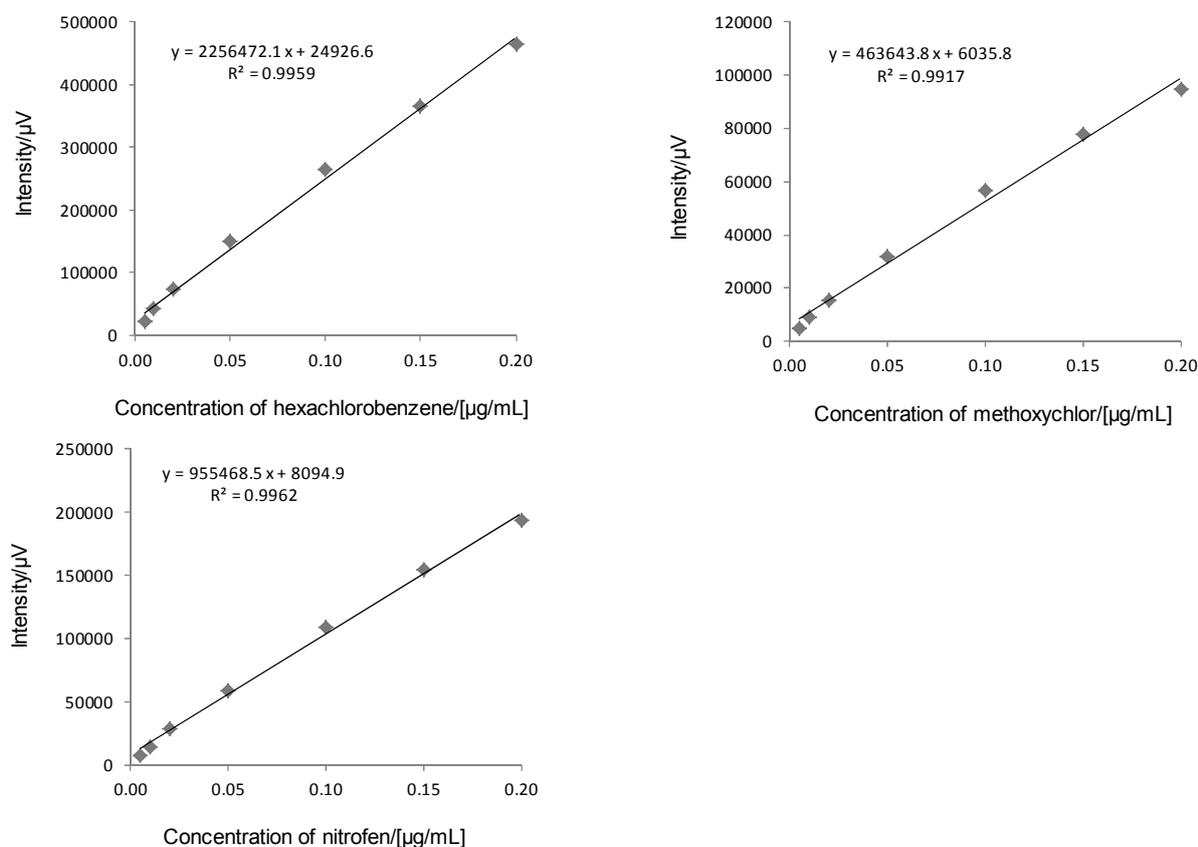


Fig. 1-1 Calibration curves of hexachlorobenzene, methoxychlor and nitrofen by peak height

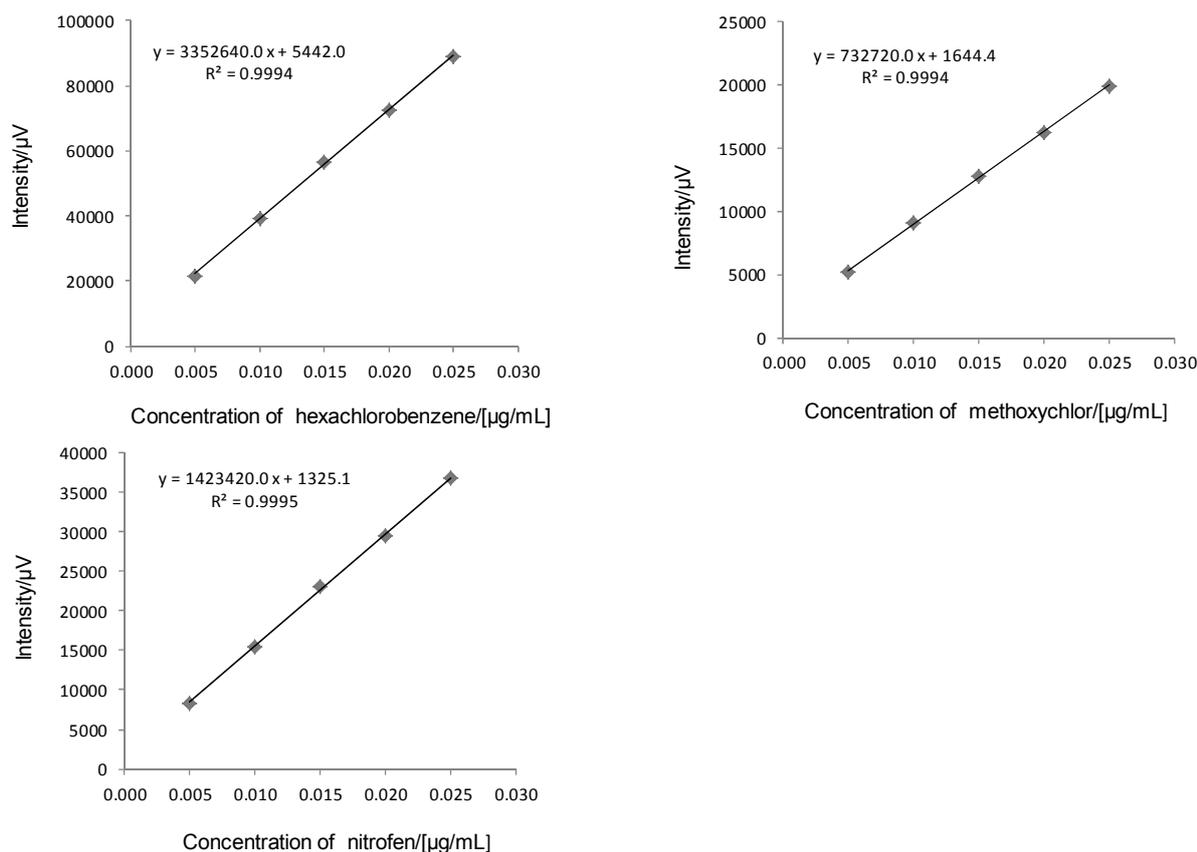


Fig. 1-2 Calibration curves of hexachlorobenzene, methoxychlor and nitrofen by peak height (low concentration)

### 3.2 妨害物質の検討

Table 2 に示した試料を用い、妨害物質の検討を行った。検討に用いた粉ミルク（犬用）2 点については、いずれも抽出溶媒で振り混ぜると固まりが生じ、粉ミルク（犬用）2 では試料溶液を調製出来なかった。粉ミルク（犬用）2 以外の各 1 点を用い、有機塩素系農薬収載法により調製した試料溶液をガスクロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムを確認した結果、粉ミルク以外の試料において定量を妨げるピークは認められなかった。粉ミルク（犬用）1 については、抽出溶媒で振り混ぜると固まりが生じ、その後の吸引ろ過、多孔性ケイソウ土カラム処理に時間を要した。粉ミルク（犬用）1 の試料溶液のクロマトグラムは、多くの夾雑ピークが認められた。夾雑ピークの大きさ及び保持時間は、測定の都度変わり、夾雑ピークが測定対象成分であるか妨害ピークであるかの判別が行えなかった。

なお、成型ジャーキー（猫用）2 の試料溶液のクロマトグラムでは、*p,p'*-DDE の保持時間に定量限界濃度未満のピークを、素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用・猫用）の試料溶液のクロマトグラムではヘキサクロロベンゼンの保持時間にヘキサクロロベンゼンの定量限界濃度以上（ヘキサクロロベンゼンとして 0.0071 mg/kg 相当）のピークを検出した。当該試料溶液について測定に用いる溶融石英製キャピラリーカラムを DB-1701 からコーティングの材質が異なる DB-5 に変えて測定し同様の結果となったことから、当該ピークはそれぞれ *p,p'*-DDE 及びヘキサクロロベンゼンであると判断した。

本検討で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

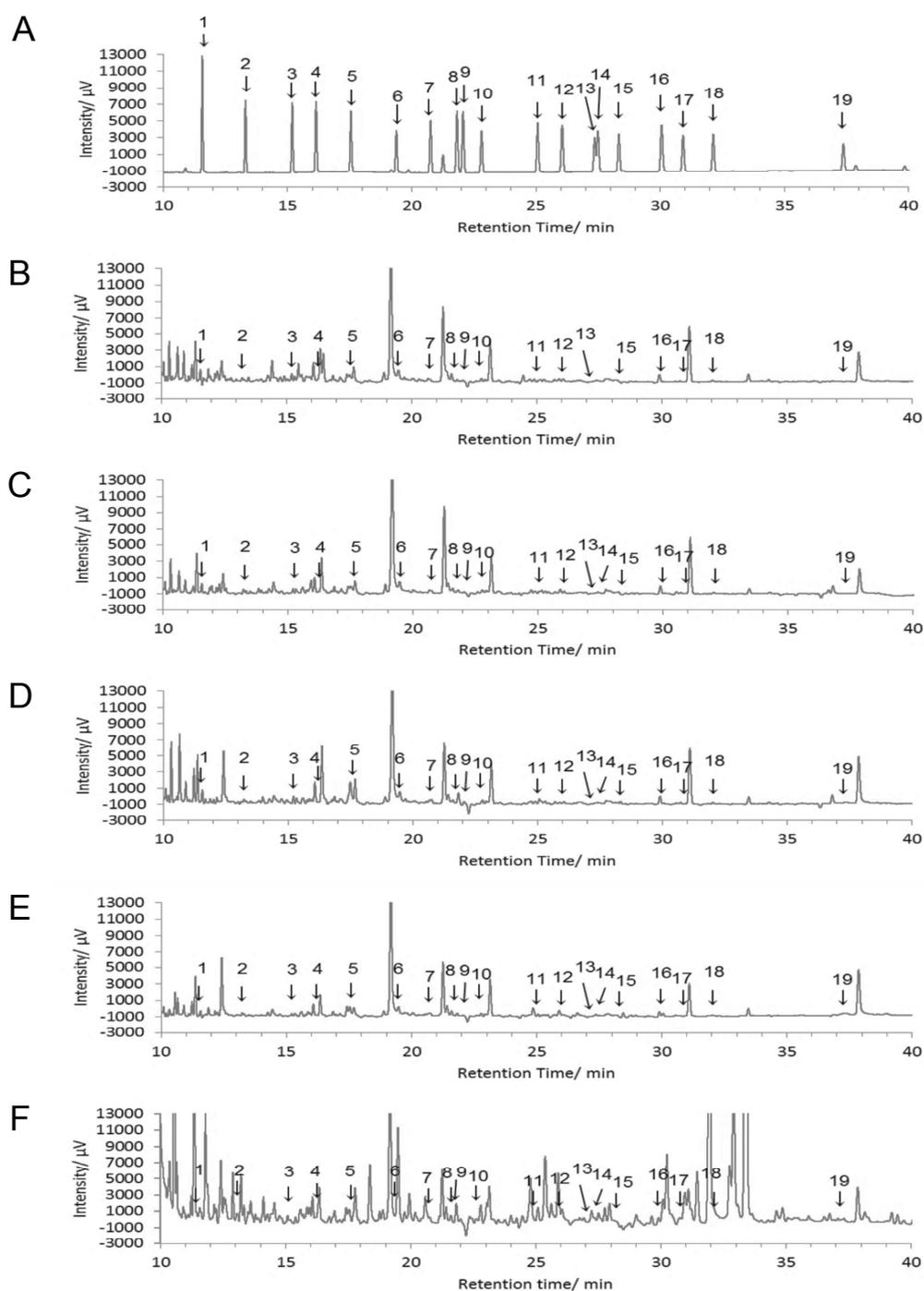


Fig. 2 Chromatograms of standard and blank solutions

(GC-ECD conditions are shown in Table 5. Arrows indicate the retention time of pesticides.)

1 Hexachlorobenzene	6 $\beta$ -BHC	11 <i>p,p'</i> -DDE	16 Nitrofen
2 $\alpha$ -BHC	7 $\delta$ -BHC	12 Dieldrin	17 <i>p,p'</i> -DDD
3 $\gamma$ -BHC	8 Heptachlor epoxide	13 <i>o,p'</i> -DDD	18 <i>p,p'</i> -DDT
4 Heptachlor	9 <i>trans</i> -Heptachlor epoxide (for reference)	14 Endrin	19 Methoxychlor
5 Aldrin	10 <i>o,p'</i> -DDE	15 <i>o,p'</i> -DDT	

A: Standard solution (0.005  $\mu\text{g/mL}$ : 0.005 ng as each pesticide)

B~F: Sample solutions (B: formed jerky (for cats) 3, C: dried jerky (hard) (for dogs), D: dried jerky (soft) (for dogs) 3, E: confectionery (biscuit for dogs) 2 and F: milk powder (for dogs) 1)

### 3.3 添加回収試験

Table 2 に示した成型ジャーキー（猫用）3，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用），素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）3，菓子類（犬用ビスケット）2 及び粉ミルク（犬用）1 に，アルドリン， $\alpha$ -BHC， $\beta$ -BHC， $\gamma$ -BHC， $\delta$ -BHC，ディルドリン，エンドリン，ヘキサクロロベンゼン，ヘプタクロル，ヘプタクロルエポキシド，*trans*-ヘプタクロルエポキシド及びニトロフェンとして 0.002 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.005 及び 0.025  $\mu$ g/mL 相当量），*o,p'*-DDD，*p,p'*-DDD，*o,p'*-DDE，*p,p'*-DDE，*o,p'*-DDT 及び *p,p'*-DDT（以下「DDT 類」という．）として 0.002 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.005 及び 0.05  $\mu$ g/mL 相当量）並びにメトキシクロールとして 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.025 及び 0.125  $\mu$ g/mL 相当量）になるようにそれぞれ添加後よく混合し，一夜静置した後に有機塩素系農薬収載法に従って試験を実施し，平均回収率及び繰返し精度を求めた．

なお，DDT 類として 0.1 mg/kg 相当量添加した試験区の測定には，ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液を更に 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）で正確に 5 倍希釈し，DDT 類の測定に供する最終試料溶液とした．

その結果は Table 6 のとおりであり，成型ジャーキー（猫用）3，素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）（犬用），素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）（犬用）3 及び菓子類（犬用ビスケット）2 については有機塩素系農薬 18 成分の平均回収率は，81.0~118 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 11 %以下であり，検査法第 11 章 試験法の妥当性確認法<sup>1)</sup>（以下「試験法の妥当性確認法」という．）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった．粉ミルク（犬用）1 で認められた夾雑ピークは，前述のとおり測定対象成分であるか妨害ピークであるかの判別が行えなかったため，添加回収試験値から夾雑ピークの分析値は差し引かず，その結果は参考とした．粉ミルク（犬用）1 については，有機塩素系農薬 18 成分の平均回収率は 46.8~170 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 15 %以下であった．*p,p'*-DDD，*p,p'*-DDE，*o,p'*-DDT，エンドリン，ニトロフェン及びヘキサクロロベンゼンについての平均回収率は，試験法の妥当性確認法に定められた真度の目標値の範囲外であった．粉ミルクの結果は，低回収率の傾向にあったが，*p,p'*-DDD，エンドリン及びニトロフェンでは，120 %を超える回収率になる結果も認められた．これは，粉ミルクの抽出操作において抽出溶媒で振り混ぜる際に固まりが生じその後の操作が困難になること，夾雑ピークの影響等が要因と考えられた．

得られたクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した．

Table 6 Recoveries for pesticides

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Samples	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Aldrin	0.002	Formed jerky (for cats) 3	95.3	6.2
		Dried jerky (hard) (for dogs)	110	7.5
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	97.6	1.6
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	108	4.7
		Milk powder (for dogs) 1	70.1	9.0
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	102	5.1
		Dried jerky (hard) (for dogs)	97.6	6.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	95.2	4.3
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	98.7	2.2
		Milk powder (for dogs) 1	60.8	9.7
$\alpha$ -BHC	0.002	Formed jerky (for cats) 3	87.7	4.7
		Dried jerky (hard) (for dogs)	92.7	4.2
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	89.9	3.3
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	94.6	1.9
		Milk powder (for dogs) 1	85.0	13
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	95.9	6.7
		Dried jerky (hard) (for dogs)	95.3	5.5
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	88.3	2.8
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	92.6	1.4
		Milk powder (for dogs) 1	71.4	3.1
$\beta$ -BHC	0.002	Formed jerky (for cats) 3	103	4.6
		Dried jerky (hard) (for dogs)	109	3.9
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	104	3.6
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	111	2.7
		Milk powder (for dogs) 1	99.0	5.3
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	111	6.1
		Dried jerky (hard) (for dogs)	107	7.4
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	97.8	3.0
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	109	3.0
		Milk powder (for dogs) 1	84.3	3.5
$\gamma$ -BHC	0.002	Formed jerky (for cats) 3	94.6	3.3
		Dried jerky (hard) (for dogs)	97.7	2.3
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	99.3	2.2
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	99.5	1.9
		Milk powder (for dogs) 1	82.7	5.6
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	103	5.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	101	6.2
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	94.4	2.5
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	97.1	1.2
		Milk powder (for dogs) 1	78.0	3.4

Table 6 Recoveries for pesticides (continuation)

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Samples	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
<i>δ</i> -BHC	0.002	Formed jerky (for cats) 3	98.0	4.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	106	6.4
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	100	3.9
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	107	3.1
		Milk powder (for dogs) 1	88.3	7.2
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	107	8.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	103	7.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	100	4.9
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	102	3.2
		Milk powder (for dogs) 1	82.3	6.1
<i>o p'</i> -DDD	0.002	Formed jerky (for cats) 3	98.2	3.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	105	3.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	95.9	5.7
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	109	4.8
		Milk powder (for dogs) 1	76.8	2.8
	0.1	Formed jerky (for cats) 3	109	0.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	105	1.9
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	109	2.0
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	109	3.6
		Milk powder (for dogs) 1	89.9	5.6
<i>p p'</i> -DDD	0.002	Formed jerky (for cats) 3	99.7	4.6
		Dried jerky (hard) (for dogs)	107	1.2
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	95.3	8.3
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	105	4.8
		Milk powder (for dogs) 1	135	15
	0.1	Formed jerky (for cats) 3	107	1.2
		Dried jerky (hard) (for dogs)	106	2.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	108	2.8
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	110	4.1
		Milk powder (for dogs) 1	87.6	5.6
<i>o p'</i> -DDE	0.002	Formed jerky (for cats) 3	102	5.4
		Dried jerky (hard) (for dogs)	106	3.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	99.5	4.6
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	118	5.9
		Milk powder (for dogs) 1	79.1	8.5
	0.1	Formed jerky (for cats) 3	107	1.4
		Dried jerky (hard) (for dogs)	107	2.3
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	110	1.6
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	107	3.7
		Milk powder (for dogs) 1	83.1	7.5

Table 6 Recoveries for pesticides (continuation)

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Samples	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
<i>p,p'</i> -DDE	0.002	Formed jerky (for cats) 3	99.1	6.9
		Dried jerky (hard) (for dogs)	101	3.9
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	105	2.8
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	100	2.3
		Milk powder (for dogs) 1	68.8	8.3
	0.1	Formed jerky (for cats) 3	104	2.4
		Dried jerky (hard) (for dogs)	102	1.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	110	1.1
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	106	3.0
		Milk powder (for dogs) 1	77.0	9.3
<i>o,p'</i> -DDT	0.002	Formed jerky (for cats) 3	88.6	11
		Dried jerky (hard) (for dogs)	91.8	3.3
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	92.0	8.1
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	93.0	3.5
		Milk powder (for dogs) 1	46.8	10
	0.1	Formed jerky (for cats) 3	108	2.8
		Dried jerky (hard) (for dogs)	105	1.7
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	109	2.5
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	108	2.7
		Milk powder (for dogs) 1	78.0	6.7
<i>p,p'</i> -DDT	0.002	Formed jerky (for cats) 3	98.5	5.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	102	5.9
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	93.1	5.2
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	103	5.6
		Milk powder (for dogs) 1	77.1	5.4
	0.1	Formed jerky (for cats) 3	108	2.1
		Dried jerky (hard) (for dogs)	102	0.5
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	108	1.5
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	108	4.1
		Milk powder (for dogs) 1	80.1	10
Dieldrin	0.002	Formed jerky (for cats) 3	99.3	6.0
		Dried jerky (hard) (for dogs)	103	2.9
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	98.6	5.1
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	97.8	7.8
		Milk powder (for dogs) 1	96.7	3.9
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	111	8.6
		Dried jerky (hard) (for dogs)	106	7.3
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	99.7	5.9
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	104	1.8
		Milk powder (for dogs) 1	80.3	6.5

Table 6 Recoveries for pesticides (continuation)

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Samples	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Endrin	0.002	Formed jerky (for cats) 3	97.4	4.0
		Dried jerky (hard) (for dogs)	108	4.7
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	105	2.4
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	104	2.0
		Milk powder (for dogs) 1	170	7.3
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	111	7.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	112	8.0
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	110	5.1
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	110	1.3
		Milk powder (for dogs) 1	96.3	6.2
Hexachlorobenzene	0.002	Formed jerky (for cats) 3	84.9	4.4
		Dried jerky (hard) (for dogs)	90.0	2.0
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	93.1	5.2
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	88.2	3.0
		Milk powder (for dogs) 1	58.6	14
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	87.8	7.9
		Dried jerky (hard) (for dogs)	92.3	6.1
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	84.2	3.3
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	81.0	3.5
		Milk powder (for dogs) 1	54.4	11
Heptachlor	0.002	Formed jerky (for cats) 3	91.1	5.0
		Dried jerky (hard) (for dogs)	94.6	5.1
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	93.6	5.0
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	99.6	2.9
		Milk powder (for dogs) 1	62.0	6.9
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	107	3.8
		Dried jerky (hard) (for dogs)	104	7.1
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	95.9	4.1
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	100	1.6
		Milk powder (for dogs) 1	67.3	7.2
Heptachlor epoxide	0.002	Formed jerky (for cats) 3	96.0	5.1
		Dried jerky (hard) (for dogs)	106	2.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	112	4.1
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	101	1.9
		Milk powder (for dogs) 1	94.6	3.0
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	111	5.1
		Dried jerky (hard) (for dogs)	107	6.6
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	101	5.0
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	106	0.9
		Milk powder (for dogs) 1	80.6	4.8

Table 6 Recoveries for pesticides (continuation)

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Samples	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
<i>trans</i> -Heptachlor epoxide	0.002	Formed jerky (for cats) 3	96.1	7.9
		Dried jerky (hard) (for dogs)	95.2	4.0
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	101	5.8
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	101	3.2
		Milk powder (for dogs) 1	84.6	9.5
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	108	7.8
		Dried jerky (hard) (for dogs)	105	6.4
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	99.4	2.2
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	104	1.8
		Milk powder (for dogs) 1	77.6	4.5
Methoxychlor	0.01	Formed jerky (for cats) 3	97.1	9.9
		Dried jerky (hard) (for dogs)	95.4	3.1
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	108	8.2
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	106	5.1
		Milk powder (for dogs) 1	94.8	3.6
	0.05	Formed jerky (for cats) 3	110	4.5
		Dried jerky (hard) (for dogs)	103	7.4
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	99.7	3.4
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	105	2.2
		Milk powder (for dogs) 1	85.4	2.1
Nitrofen	0.002	Formed jerky (for cats) 3	101	5.3
		Dried jerky (hard) (for dogs)	111	7.2
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	101	4.3
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	109	3.2
		Milk powder (for dogs) 1	125	3.6
	0.01	Formed jerky (for cats) 3	114	5.0
		Dried jerky (hard) (for dogs)	106	4.7
		Dried jerky (soft) (for dogs) 3	101	4.0
		Confectionery (biscuit for dogs) 2	107	2.7
		Milk powder (for dogs) 1	91.2	7.7

Colored cells stand for outside the criteria of recovery rate at each concentration listed in the 3 (3) of chapter 11 of Analytical standards of petfood.

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

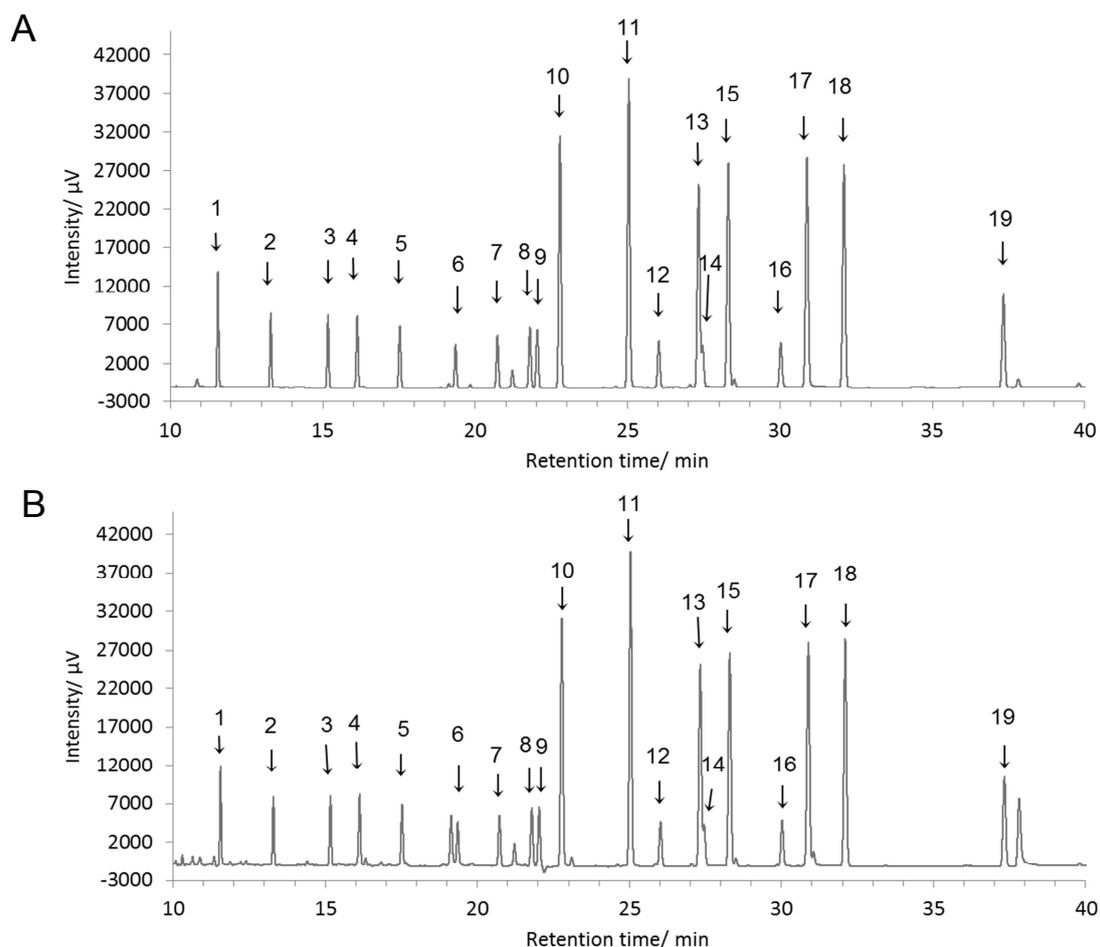


Fig. 3 Chromatograms of standard and spiked sample solution

(GC-ECD conditions are shown in Table 5. Arrows indicate the retention time of pesticides.)

1 Hexachlorobenzene	6 $\beta$ -BHC	11 <i>p,p'</i> -DDE	16 Nitrofen
2 $\alpha$ -BHC	7 $\delta$ -BHC	12 Dieldrin	17 <i>p,p'</i> -DDD
3 $\gamma$ -BHC	8 Heptachlor epoxide	13 <i>o,p'</i> -DDD	18 <i>p,p'</i> -DDT
4 Heptachlor	9 <i>trans</i> -Heptachlor epoxide (for reference)	14 Endrin	19 Methoxychlor
5 Aldrin	10 <i>o,p'</i> -DDE	15 <i>o,p'</i> -DDT	

A: Standard solution (0.05  $\mu\text{g/mL}$  for six DDT related compounds, 0.025  $\mu\text{g/mL}$  for methoxychlor and 0.005  $\mu\text{g/mL}$  for other twelve compounds: 0.05 ng, 0.025 ng and 0.005 ng as each pesticide.)

B: Five-fold diluted sample solution of formed jerky (for cats) 3 spiked at high concentration of pesticide (spiked at 0.1 mg/kg of six DDT related compounds, 0.05 mg/kg of methoxychlor and 0.01 mg/kg of other twelve compounds: 0.05  $\mu\text{g/mL}$ , 0.025  $\mu\text{g/mL}$  and 0.005  $\mu\text{g/mL}$ , as each pesticides in the diluted sample solution)

### 3.4 定量限界及び検出限界

スナック製品 5 分類の各試料に有機塩素系農薬収載法の各農薬の定量限界濃度相当量を添加した添加回収試験を実施し、平均回収率、繰返し精度の標準偏差及びピークの *SN* 比から総合的に判断した。

その結果、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）、素材乾燥ジャーキー（ソ

フトタイプ) 及び菓子類中の各有機塩素系農薬の定量限界及び検出限界は、有機塩素系農薬収載法に規定されたドライ製品及びセミドライ製品におけるメトキシクロールの定量限界 0.01 mg/kg 及びその他の農薬の定量限界各 0.002 mg/kg 並びにメトキシクロールの検出限界 0.003 mg/kg 及びその他の農薬の検出限界各 0.0007 mg/kg を変更することなく適用できると考えられた。一方、粉ミルクについては、3.2 で記載した夾雑ピークの影響で回収率が不良の成分があり、ピークの SN 比も安定しなかったため、定量限界等の検討はできなかった。

なお、Table 6 に示したとおり、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）、素材乾燥ジャーキー（ソフトタイプ）及び菓子類の当該定量限界における添加回収試験結果は、試験法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値を満たした。

#### 4 まとめ

検査法に収載されているドライ製品及びセミドライ製品を対象とする有機塩素系農薬収載法について、ニトロフェン、ヘキサクロロベンゼン及びメトキシクロールの検量線並びに本法のスナック製品 5 分類への適用範囲拡大について検討した結果、以下の結果が得られた。

1) ニトロフェン、ヘキサクロロベンゼン及びメトキシクロールの検量線について、各 0.005~0.2 µg/mL（注入量として各 0.005~0.2 ng 相当量）の範囲で直線性を示したことから、検量線作成用標準液の最低濃度をウェット製品有機塩素系農薬収載法に合わせることにした。

なお、当該検量線の濃度範囲は、各農薬を 0.002~0.08 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する。

2) 成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類について、有機塩素系農薬収載法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。一方、粉ミルクについては、多くの夾雑ピークが認められ、夾雑ピークの大きさ及び保持時間は、測定の都度変わり、夾雑ピークが測定対象成分であるか妨害ピークであるかの判別が行えなかった。

3) 成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルクに、アルドリノ、 $\alpha$ -BHC、 $\beta$ -BHC、 $\gamma$ -BHC、 $\delta$ -BHC、ディルドリン、エンドリン、ヘキサクロロベンゼン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、*trans*-ヘプタクロルエポキシド及びニトロフェンとして 0.002 及び 0.01 mg/kg 相当量、DDT 類として 0.002 及び 0.1 mg/kg 相当量並びにメトキシクロールとして 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類については、試験法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られ、有機塩素系農薬収載法の適用が可能であると考えられた。一方、夾雑ピークが測定対象成分であるか妨害ピークであるかの判別が行えず、その結果を参考とした、粉ミルクについては、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDT、エンドリン、ヘキサクロロベンゼン及びニトロフェンについて試験法の妥当性確認法に定められた真度の目標値を逸脱していた。

4) 成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類中の各有機塩素系農薬の定量限界及び検出限界は、有機塩素系農薬収載法に規定されたドライ製品及びセミドライ製品におけるメトキシクロールの定量限界 0.01 mg/kg 及びその他の農薬の定量限界各

0.002 mg/kg 並びにメトキシクロールの検出限界 0.003 mg/kg 及びその他の農薬の検出限界各 0.0007 mg/kg を変更することなく適用できると考えられた。一方、粉ミルクについては、定量限界等の検討は行えなかった。

- 5) 有機塩素系農薬収載法の粉ミルクへの適用については、抽出溶媒による振とうの際に固まりが生じその後の操作が困難であり、試料によっては試料溶液の調製が行えない試料があったこと、また、得られたクロマトグラムには、定量に影響する夾雑ピークが認められたことから不適と考えられた。

## 文 献

- 1) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号 (2009).
- 2) U.S. Food and Drug Administration: FDA Releases Progress on Jerky Pet Treat Investigation, <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm371450.htm>, cited 28 Dec. 2016.
- 3) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).

**技術レポート**

## 6 とうもろこしサイレージ中のかび毒の定量法に関する検討 ～アフラトキシン B<sub>1</sub>, ゼアラレノン及びデオキシニバレノール～

伊藤 千晶\*, 佐藤 憲大\*

### Study of Determination Method of Mycotoxins in Corn Silage ~ Aflatoxin B<sub>1</sub>, Zearalenone and Deoxynivalenol ~

Chiaki ITO\* and Norihiro SATO\*

(\* Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

The applicability of analytical methods of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) listed in Analytical Standards of Feeds to corn silage was investigated.

Tested methods for AFB<sub>1</sub> were simultaneous determination methods using a liquid chromatograph (LC) and using a LC equipped with a photochemical reactor. For DON and ZEN, a simultaneous determination method using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS) was tested.

Corn silage samples were air-dried and ground. In the simultaneous determination method of DON and ZEN, there were some cases where the specified amount of extraction solvent was insufficient for corn silage.

The spike test results suggested that both determination methods of AFB<sub>1</sub> may be applicable to corn silage, and that the simultaneous determination method for DON and ZEN needs some improvements with respect to the preparation of sample solution and the selectivity of DON.

Key words: Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>); deoxynivalenol (DON); zearalenone (ZEN); liquid chromatograph (LC); photochemical reactor; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); corn silage

キーワード：アフラトキシン B<sub>1</sub>；デオキシニバレノール；ゼアラレノン；液体クロマトグラフ；フォトケミカルリアクター；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；とうもろこしサイレージ

## 1 緒 言

飼料自給率の向上は、食料自給率向上の重要な施策として位置付けられ、とうもろこしサイレージを含む粗飼料の増産が積極的に行われている。その一方で、とうもろこしサイレージからデオキシニバレノール（以下「DON」という。）、ゼアラレノン（以下「ZEN」という。）等のかび毒が検出されており<sup>1)</sup>、農林水産省が委託事業として平成 24 年度から汚染実態調査を実施している。飼料分析基準<sup>2)</sup>に記載されたこれらのかび毒の分析法は、とうもろこしサイレージへの適否が明らかではないことから、上記の汚染実態調査では、事業者が独自に開発した分析法が用いられている。

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

しかし、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準<sup>3)</sup>には、DON及びZENの管理基準が規定されており、牛用飼料も対象になることから、将来的に国産粗飼料について基準への適否の判定のための分析法を定めておく必要があると考えられる。そこで、飼料分析基準収載法のとうもろこしサイレージへの適用の可否について検討した。合わせて、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準が定められているアフラトキシンB<sub>1</sub>（以下「AFB<sub>1</sub>」という。）についても、同様に検討を行った。

とうもろこしサイレージに適用されている方法として、平成27年度の汚染実態調査で用いられた定量法<sup>4)</sup>（以下「実態調査法」という。）を参考に、以下の飼料分析基準収載法について検討を行った。AFB<sub>1</sub>については、実態調査法がフォトケミカルリアクターを接続した高速液体クロマトグラフ（以下「LC」という。）を用いた方法であったため、トリフルオロ酢酸を用いて誘導体化を行う飼料分析基準第5章第3節2アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法（以下「TFA法」という。）及びフォトケミカルリアクターを用いる飼料分析基準第5章第3節3アフラトキシンの液体クロマトグラフ-フォトケミカルリアクターによる同時分析法（以下「PR法」という。）の適用を検討した。また、DON及びZENの定量法については、実態調査法が液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による分析法であったため、DON及びZENを含む一斉分析法である飼料分析基準第5章第3節1かび毒の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による一斉分析法（以下「一斉法」という。）の適用を検討した。

## 2 実験方法

### 2.1 試料

検討には6種類のとうもろこしサイレージを用いた。試料の調製方法は、飼料分析基準の規定に従い、試料200g以上の必要量をとってその重さを量り、60℃で6~25時間乾燥後、更に室内で静置して風乾し、再び重さを量った後、1mmのスクリーンを装着した粉砕器で粉砕した。

### 2.2 試薬

1) アセトニトリル及びメタノールは、LCで測定する分析法にはLC用、LC-MS/MSで測定する分析法には液体クロマトグラフ質量分析計用を用いた。トリフルオロ酢酸はReagent Plus（純度99%，Sigma Aldrich製）を用いた。酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用（1mol/L水溶液，関東化学製）を用いた。水はMilli-Q Integral 5（Millipore製）により精製した超純水（JIS K0211の5218に定義された超純水）を用いた。

#### 2) AFB<sub>1</sub>標準液

市販のアフラトキシン（B<sub>1</sub>，B<sub>2</sub>，G<sub>1</sub>，G<sub>2</sub>）混合標準液（各成分25µg/mL，アセトニトリル溶液，Sigma-Aldrich製）をAFB<sub>1</sub>標準原液とした。AFB<sub>1</sub>標準原液1mLを試験管に正確に取り、アセトニトリル1.5mLを正確に加えて混合し、1mL中にAFB<sub>1</sub>として10µgを含有するAFB<sub>1</sub>標準液を調製した。

##### i TFA法

AFB<sub>1</sub>標準液（10µg/mL）250µLを10mLの全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加えて1mL中にAFB<sub>1</sub>として250ngを含有する標準液を調製した。

使用に際して、この液4，10，20及び40µLを、飼料分析基準第5章第3節2アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法に従い、それぞれトリフルオロ酢酸により誘導体化を行い、1mL中にAFB<sub>1</sub>として1，2.5，5.0及び10.0ng相当量を含有する各AFB<sub>1</sub>誘導体

標準液を調製した。

ii PR 法

AFB<sub>1</sub> 標準液 (10 µg/mL) 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ, 更に標線までアセトニトリル-水 (9+1) を加えて 1 mL 中に AFB<sub>1</sub> として 100 ng を含有する標準液を調製した。

使用に際して, この液の一定量をアセトニトリル-水 (9+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に AFB<sub>1</sub> として 2.5, 5, 10 及び 20 ng を含有する各 AFB<sub>1</sub> 標準液を調製した。

3) DON 標準原液

DON 標準品 (純度 99.4 %, Biopure 製) 2 mg を正確に量って 10 mL の全量フラスコに入れ, アセトニトリルを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて DON 標準原液を調製した (この液 1 mL は, DON として 200 µg を含有する. ) .

4) ZEN 標準液

ZEN 標準品 (純度 99.7 %, Sigma-Aldrich 製) 2 mg を正確に量って 10 mL の全量フラスコに入れ, アセトニトリルを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて 1 mL 中に ZEN として 200 µg を含有する標準原液を調製した. この液 1 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れ, 更に標線までアセトニトリルを加えて ZEN 標準液を調製した (この液 1 mL は, ZEN として 20 µg を含有する. ) .

5) DON 及び ZEN 混合標準液

DON 標準原液 5 mL 及び ZEN 標準液 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ, 水 16 mL を加えて混合し, 更に標線までアセトニトリルを加えて DON 及び ZEN 混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, DON として 10 µg 及び ZEN として 0.2 µg を含有する. ) .

使用に際して, DON 及び ZEN 混合標準原液の一定量をアセトニトリル-水 (21+4) で正確に希釈し, 1 mL 中に DON として 50, 100, 200, 500 及び 1000 ng, ZEN として 1, 2, 4, 10 及び 20 ng をそれぞれ含有する DON 及び ZEN 混合標準液を調製した. 更に各 DON 及び ZEN 混合標準液の一定量をそれぞれ同容量の酢酸 (1+100) で希釈して, 各検量線作成用 DON 及び ZEN 混合標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

検討に用いた装置及び器具を Table 1 に示した。

Table 1 Instruments and equipments

Mycotoxins	Methods	Instruments and equipments
	TFA method <sup>a)</sup>	1) Grinder: ZM 200, Retsch (1 mm screen, rotational speed: 14000 rpm) 2) Shaker: Strong shaker SR-2DW (shake speed: 300 rpm), TAITEC 3) Multifunctional column: MycoSep 226 AflaZon+, Romer Labs 4) LC: LC system: Prominence, Shimadzu Fluorescence detector: RF-20AX, Shimadzu
Aflatoxin B <sub>1</sub> (AFB <sub>1</sub> )	PR method <sup>b)</sup>	1) Grinder: ZM 200, Retsch (1 mm screen, rotational speed: 14000 rpm) 2) Shaker: Strong shaker SR-2DW (shake speed: 300 rpm), TAITEC 3) Multifunctional column: MycoSep 226 AflaZon+, Romer Labs 4) LC: LC system: prominence, Shimadzu Photochemical reaction system: Photochemical reactor (PHRED), AURA Industries Fluorescence detector: RF-20AX, Shimadzu
Deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN)	Simultaneous method <sup>c)</sup>	1) Grinder: ZM 200, Retsch (1 mm screen, rotational speed: 14000 rpm) 2) Shaker: Strong shaker SR-2DW (shake speed: 300 rpm), TAITEC 3) Multifunctional column: MultiSep 226 AflaZon+, Romer Labs 4) LC-MS/MS: LC system: Nexera X2, Shimadzu MS/MS detector: LCMS-8040, Shimadzu

a) Simultaneous analysis of aflatoxins by liquid chromatography (listed in Analytical Standards of Feeds, 5.3.2)

b) Simultaneous analysis of aflatoxins by liquid chromatograph-photochemical reactor (listed in Analytical Standards of Feeds, 5.3.3)

c) Simultaneous analysis of mycotoxins by liquid chromatograph / tandem mass spectrometer (listed in Analytical Standards of Feeds, 5.3.1)

## 2.4 定量方法

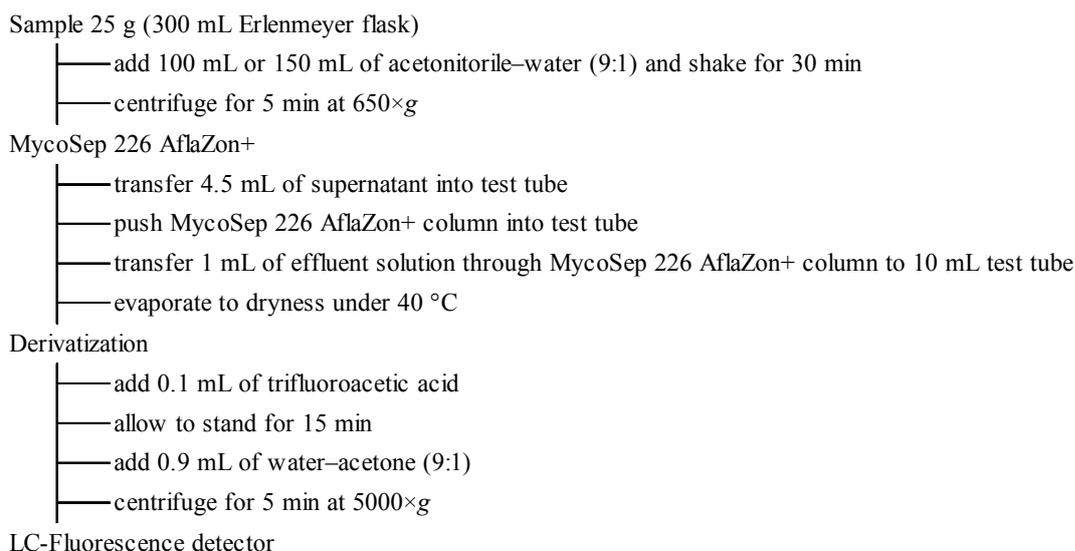
定量方法は、飼料分析基準に従い 1)~3)のとおり行った。なお、定量操作は遮光した状態で行った。

### 1) AFB<sub>1</sub> (TFA 法)

定量は TFA 法により行った。なお、分析試料の採取量は 25.0 g とし、分析試料が抽出溶媒を吸収して振り混ぜることができない場合は、溶媒の量を 100 mL から 150 mL に変更した。LC の測定条件を Table 2 に、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Table 2 Operating conditions of LC for analyzing AFB<sub>1</sub> by TFA method

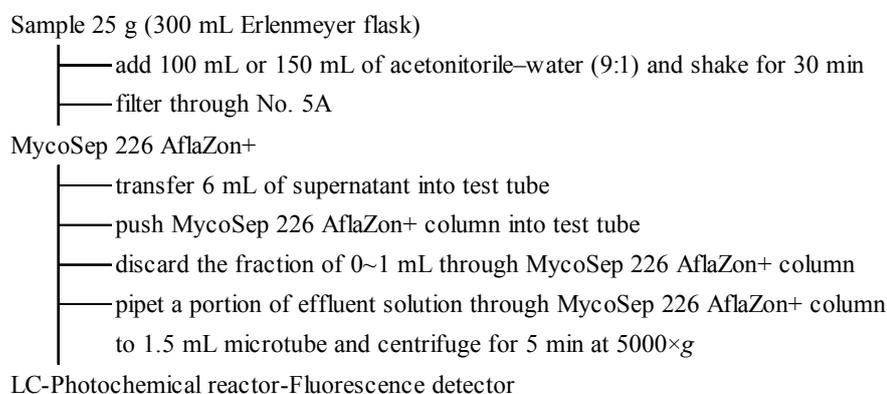
Column	Mightysil RP-18 GP (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm), Kanto Chemical
Guard column	Mightysil RP-18 GP (4.6 mm i.d. × 5 mm, 5 μm), Kanto Chemical
Mobile phase	Water-methanol (3:2)
Flow rate	0.8 mL/min
Column temperature	40 °C
Detector	Fluorescence detector (Ex: 365 nm, Em: 450 nm)

Scheme 1 Analytical procedure for AFB<sub>1</sub> in corn silage (TFA method)2) AFB<sub>1</sub> (PR 法)

定量は PR 法により行った。なお、分析試料の採取量は 25.0 g とし、分析試料が抽出溶媒を吸収して振り混ぜることができない場合は、溶媒の量を 100 mL から 150 mL に変更した。LC の測定条件を Table 3 に、定量法の概要を Scheme 2 示した。

Table 3 Operating conditions of LC for analyzing AFB<sub>1</sub> by PR method

Column	Mightysil RP-18 GP (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm), Kanto Chemical
Guard column	Mightysil RP-18 GP (4.6 mm i.d. × 5 mm, 5 μm), Kanto Chemical
Mobile phase	Water–methanol (3:2)
Flow rate	0.7 mL/min
Column temperature	35 °C
Photochemical reaction system	Low-pressure mercury lamp (15 W) (245 nm) wrapped with knitted reactor coil (0.25 mm i.d. × 10 m)
Detector	Fluorescence detector (Ex: 365 nm, Em: 450 nm)

Scheme 2 Analytical procedure for AFB<sub>1</sub> in corn silage (PR method)

## 3) DON 及び ZEN (一斉法)

定量は一斉法により行った。ただし、一斉法では、試料 50 g にアセトニトリル-水 (21+4) 100 mL を加えたとき、分析試料が抽出溶媒を吸収して振り混ぜられない場合には、溶媒の量を 150 mL とすることとなっているが、とうもろこしサイレージでは 150 mL でも振り混ぜられない場合があったことから、抽出溶媒量等を以下のように変更した。

試料採取量を 25 g, 抽出溶媒量を 100 mL に変更し、それでも振り混ぜられなかった場合は、必要に応じて抽出溶媒量を最大 150 mL まで増やした。

また、最終試料溶液濃度が検量線の範囲を超える場合は、カラム処理後の試料溶液をアセトニトリル-水 (21+4) で正確に希釈した。この溶液 1 mL を試験管に正確に入れ、酢酸 (1+100) 1 mL を正確に加え、以降、一斉法の規定のとおり、この液の一定量を遠心分離し、上澄み液を LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

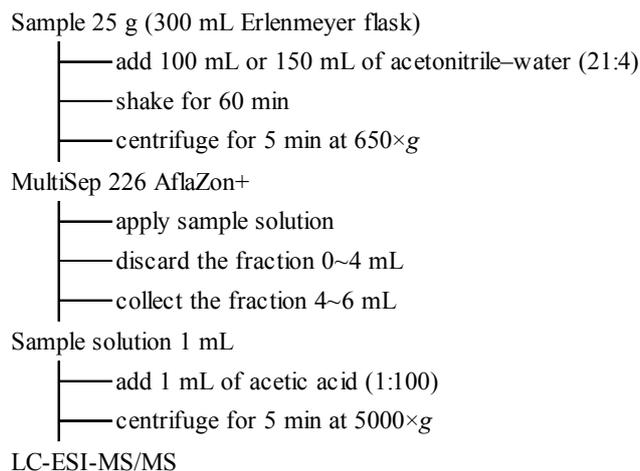
なお、LC-MS/MS の測定条件を Table 4 及び 5 に、定量法の概要を Scheme 3 に示した。

Table 4 Operating conditions of LC-MS/MS for analyzing DON and ZEN

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm), Agilent Technologies
Guard column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm i.d. × 12.5 mm, 5 μm), Agilent Technologies
Mobile phase	10 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (9:1) (hold for 1 min) → 19 min → (8:2) (hold for 15 min) → (10:0) (hold for 5 min) → (9:1) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Interface temperature	350 °C
Heat block temperature	500 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (3 L/min)
Drying gas	N <sub>2</sub> (15 L/min)
Collision gas	Ar (230 kPa)

Table 5 MS/MS parameters for analyzing DON and ZEN

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )	
DON	355	295	-	10
		-	59	25
ZEN	317	131	-	31
		-	175	25



Scheme 3 Analytical procedure for DON and ZEN in corn silage (Simultaneous method)

### 3 結果及び考察

#### 3.1 試料調製

実態調査法では、分析用試料の調製方法が飼料分析基準に規定された方法と異なり、試料を風乾せず、水分を60%以上含んだ原物のまま2 mm スクリーンで粗粉碎する方法であった。とうもろこしサイレージには子実部分や茎部分が混在しており、粉碎粒度が粗く、かつ、供試量が少ない原物中の分析では、分析値のばらつきが大きくなること、分析用試料中の水分が抽出液量や組成を変化させること等が懸念されたことから、飼料分析基準への収載を念頭においた分析法の検討については、飼料分析基準に規定された方法で調製した分析用試料を用いることとし、検討する分析法も飼料分析基準収載法により行うこととした。

#### 3.2 抽出溶媒量

一斉法において、抽出工程で試料による抽出溶媒の吸収が著しく、試料採取量25 g に対し225 mL の抽出溶媒を必要とする試料があり、試料採取量や抽出溶媒量について改良の必要性が示唆された。なお、当該試料は入手した量が少なかったため、3.3 以降の検討には用いなかった。

#### 3.3 妨害物質の検討

##### 1) AFB<sub>1</sub>

3種類のとうもろこしサイレージを用い、TFA法及びPR法により得られたクロマトグラムを確認した。その結果、いずれにおいてもAFB<sub>1</sub>の定量を妨害するピークは検出されなかった。

本検討により得られたクロマトグラムの一例をFig. 1に示した。

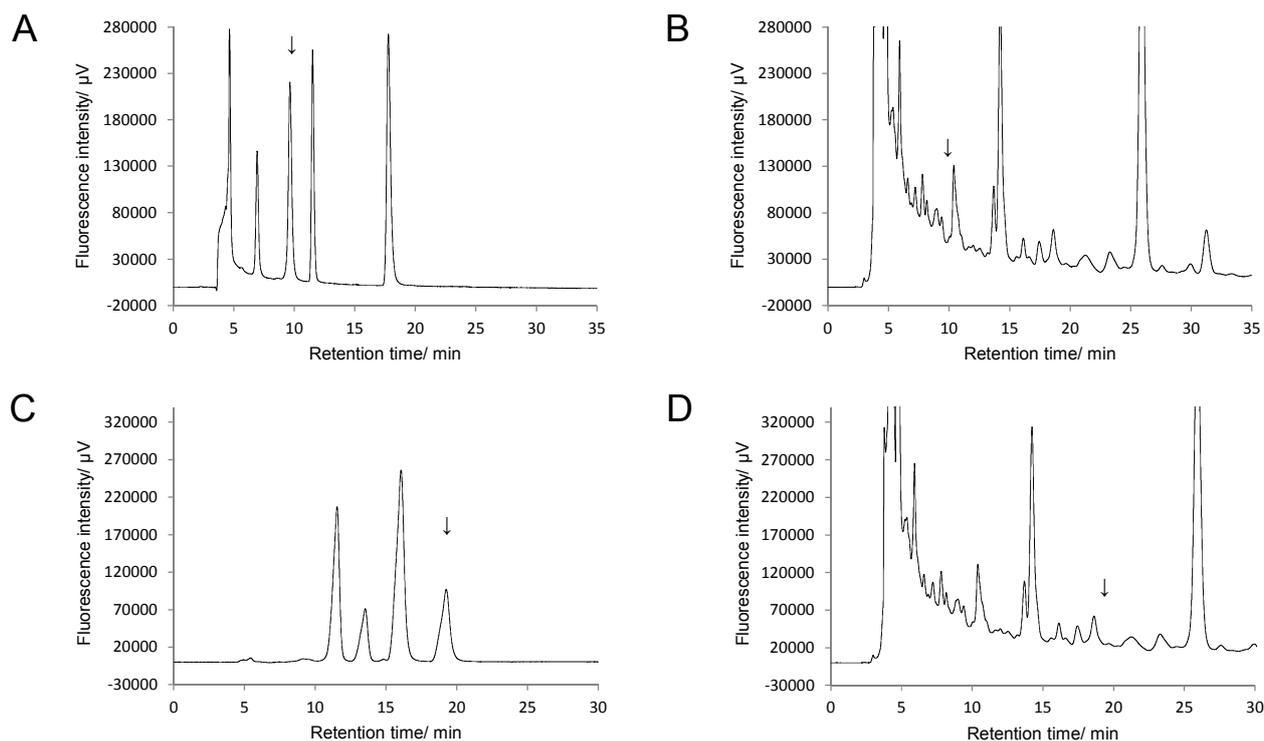


Fig. 1 Chromatograms of standard solutions and sample solutions of corn silage (blank) (LC conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention time of AFB<sub>1</sub> derivative.)

A: TFA method; Standard solution (1 ng/mL: 20 pg as AFB<sub>1</sub>)

B: TFA method; Corn silage (blank)

C: PR method; Standard solution (1 ng/mL: 20 pg as AFB<sub>1</sub>)

D: PR method; Corn silage (blank)

## 2) DON

4種類のとうもろこしサイレージを用い、一斉法により得られた選択反応検出（以下「SRM」という。）クロマトグラムを確認した。その結果、全ての試料においてDONと同じ保持時間にピークが認められ、確認イオンのピークも認められたことからDONのピークと考えられたが、定量イオンのピークと直前の妨害ピークが重なり、定量値への影響はDONとして最大0.4 mg/kg程度であった。このことから、一斉法をとうもろこしサイレージに適用しようとする場合には、精製の追加、液体クロマトグラフ条件の変更等分析法の改良が必要と考えられた。本検討により得られたSRMクロマトグラムの一例をFig. 2に示した。

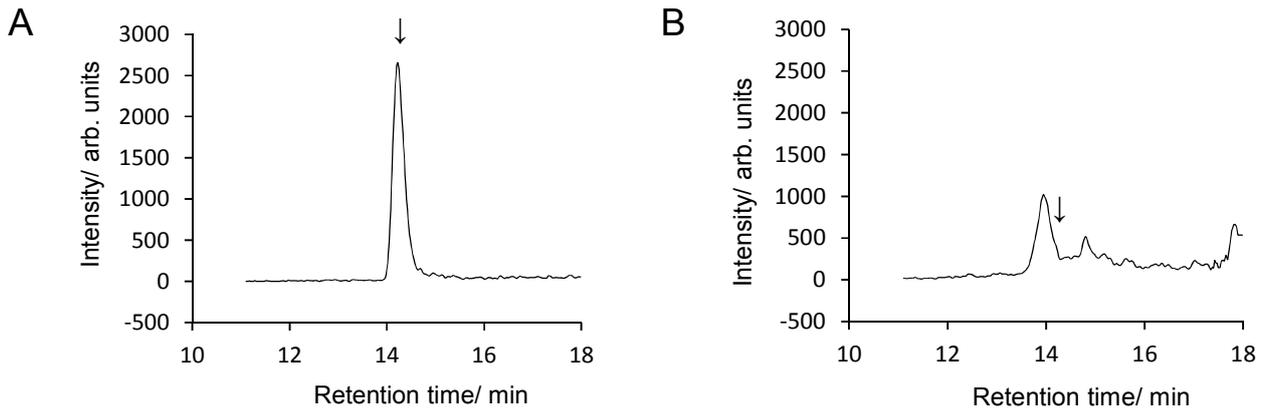


Fig. 2 SRM chromatograms of standard solution and sample solution of corn silage (naturally contaminated)

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 4 and 5. Arrows indicate the retention time of DON.)

A: Standard solution (25 ng/mL: 250 pg as DON)

B: Corn silage (naturally contaminated)

### 3) ZEN

4種類のとうもろこしサイレージを用い、一斉法により得られたSRMクロマトグラムを確認した結果、定量を妨げる妨害ピークは認められなかった。

なお、全ての試料でZENと同じ保持時間にピークが認められた。これらのピークについて、定量イオンと確認イオンの比を確認したところ、標準液と同等であったことから、ZENであると判断した。

本検討により得られたSRMクロマトグラムの一例をFig. 3に示した。

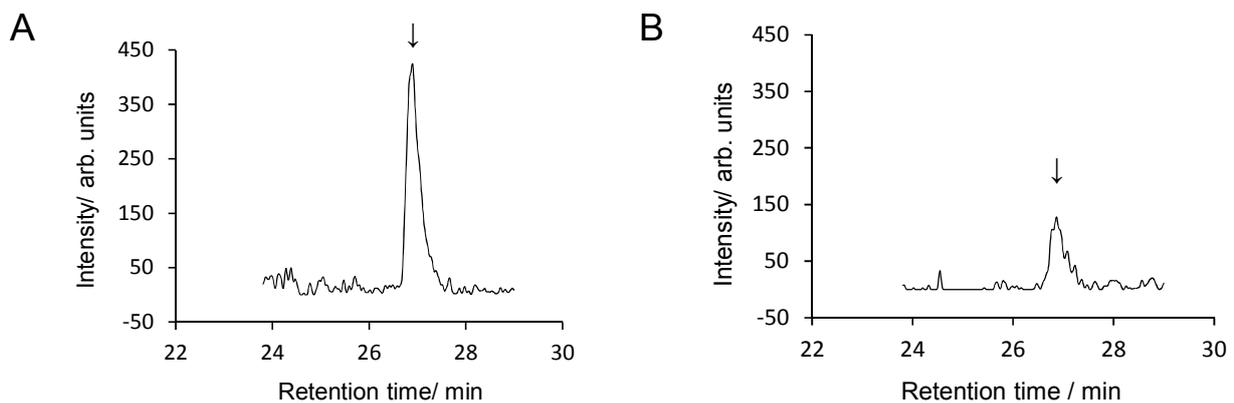


Fig. 3 SRM chromatograms of standard solution and sample solution of corn silage (naturally contaminated)

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 4 and 5. Arrows indicate the retention time of ZEN.)

A: Standard solution (0.5 ng/mL: 5 pg as ZEN)

B: Corn silage (naturally contaminated)

## 3.4 添加回収試験

1) AFB<sub>1</sub>

2.2 の 2) で調製した, 1 mL 中に AFB<sub>1</sub> として 10 µg を含有する標準液をアセトニトリルで正確に希釈し, 添加に用いた.

3 種類のとうもろこしサイレージを用い, TFA 法及び PR 法ともに, 原物換算して AFB<sub>1</sub> として 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 5 ng/mL (抽出溶媒量 100 mL の場合) または 3.3 ng/mL (抽出溶媒量 150 mL の場合)) をそれぞれ添加後よく混合し, 一夜静置した後に, 各方法に従って試験を実施し, 平均回収率及び繰返し精度を求めた.

なお, 添加は風乾物試料に対して AFB<sub>1</sub> として 0.02 mg/kg 相当量になるよう行い, 原物中濃度への換算は, 原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して, 原物 (水分含有量 60 %) 中濃度 = 風乾物 (水分含有量 10 %) 中濃度 / 2.25 の式により行った.

その結果は Table 6 のとおり, TFA 法については平均回収率 81.3~90.4 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub>) として 4.0 % 以下, PR 法については平均回収率 72.2~89.7 %, RSD<sub>r</sub> 8.4 % 以下の成績が得られ, 飼料分析基準の妥当性確認法ガイドライン<sup>2)</sup> (以下「妥当性確認法ガイドライン」という.) に定められた真度及び併行精度の目標値を満たした. TFA 法及び PR 法は, とうもろこしサイレージへの適用可能であることが示唆された.

なお, 得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した.

Table 6 Recoveries for AFB<sub>1</sub>

Sample No.	Spiked level (mg/kg original matter) <sup>a)</sup>	Methods			
		TFA method		PR method	
		Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)
1	0.01	90.4	2.9	84.2	3.3
2	0.01	83.9	4.0	89.7	8.4
3	0.01	81.3	1.4	72.2	3.8

a) AFB<sub>1</sub> was spiked to air-dried corn silage samples one night prior to extraction. The spiked level was 0.02 mg/kg air-dry matter. The level of AFB<sub>1</sub> in original matter was calculated with following equation on the assumption that the moisture content of corn silage samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

$$\begin{aligned} & \text{The level of AFB}_1 \text{ in original matter (moisture 60 \%)} \\ & = \text{the level of AFB}_1 \text{ in air-dry matter (moisture 10 \%)} / 2.25 \end{aligned}$$

b) Mean ( $n = 3$ )

c) Relative standard deviation of repeatability

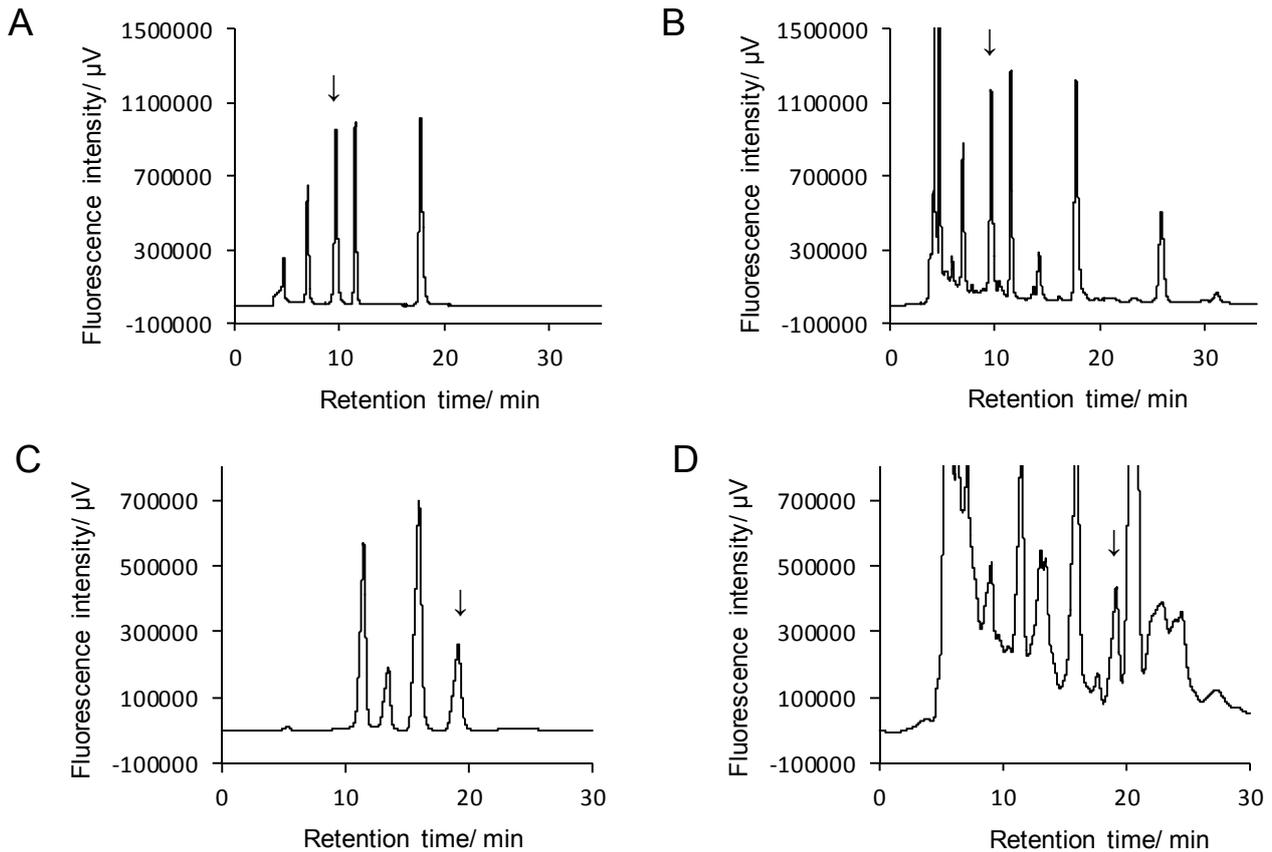


Fig. 4 Chromatograms of AFB<sub>1</sub> derivative

(LC conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of AFB<sub>1</sub> derivative.)

A: TFA method; Standard solution (2.5 ng/mL: 50 pg as AFB<sub>1</sub>)

B: TFA method; Sample solution of corn silage spiked at 0.01 mg/kg original matter of AFB<sub>1</sub>  
(3.3 ng/mL: 67 pg as AFB<sub>1</sub>)

C: PR method; Standard solution (2.5 ng/mL: 50 pg as AFB<sub>1</sub>)

D: PR method; Sample solution of corn silage spiked at 0.01 mg/kg original matter of AFB<sub>1</sub>  
(3.3 ng/mL: 67 pg as AFB<sub>1</sub>)

## 2) DON 及び ZEN

DON については 2.2 の 3) で調製した DON 標準原液を、ZEN については 2.2 の 4) で調製した標準原液を、それぞれアセトニトリルで正確に希釈し、添加に用いた。

なお、DON については 3.3 の 2) のとおり妨害ピークが認められたため参考値とし、妨害ピークの面積を DON 量に換算した値を差し引くことにより回収率を算出した。

4 種類のとうもろこしサイレージを用い、DON 及び ZEN として、原物換算して 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各成分 250 ng/mL（抽出溶媒量 100 mL の場合）又は 167 ng/mL（抽出溶媒量 150 mL の場合））をそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後、試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、添加は風乾物試料に対して DON 及び ZEN として 2 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、1) と同様に行った。

その結果は Table 7 のとおり DON については平均回収率 80.7~90.6 %，RSD<sub>r</sub> 2.8 % 以下，

ZEN については平均回収率 116~123 %,  $RSD_r$  2.7 %以下の成績となり, ZEN については妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たしていた. DON については妨害ピークが認められたため参考値であるが, 回収率及び  $RSD_r$  については, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たしていた.

なお, 得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した.

Table 7 Recoveries for DON and ZEN

Sample No.	Spiked level (mg/kg original matter) <sup>a)</sup>	Mycotoxins			
		DON		ZEN	
		Recovery <sup>b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)
1	1	87.1	1.3	123	2.7
2	1	80.7	2.5	116	0.5
4	1	81.8	2.4	119	0.3
5	1	90.6	2.8	119	2.5

a) DON and ZEN were spiked to air-dried corn silage samples one night prior to extraction.

The spiked level was 2 mg/kg air-dry matter. The levels of DON and ZEN in original matter were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of corn silage samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

The levels of mycotoxins in original matter (moisture 60 %)

= the levels of mycotoxins in air-dry matter (moisture 10 %) / 2.25

b) Mean ( $n = 3$ )

c) Relative standard deviation of repeatability

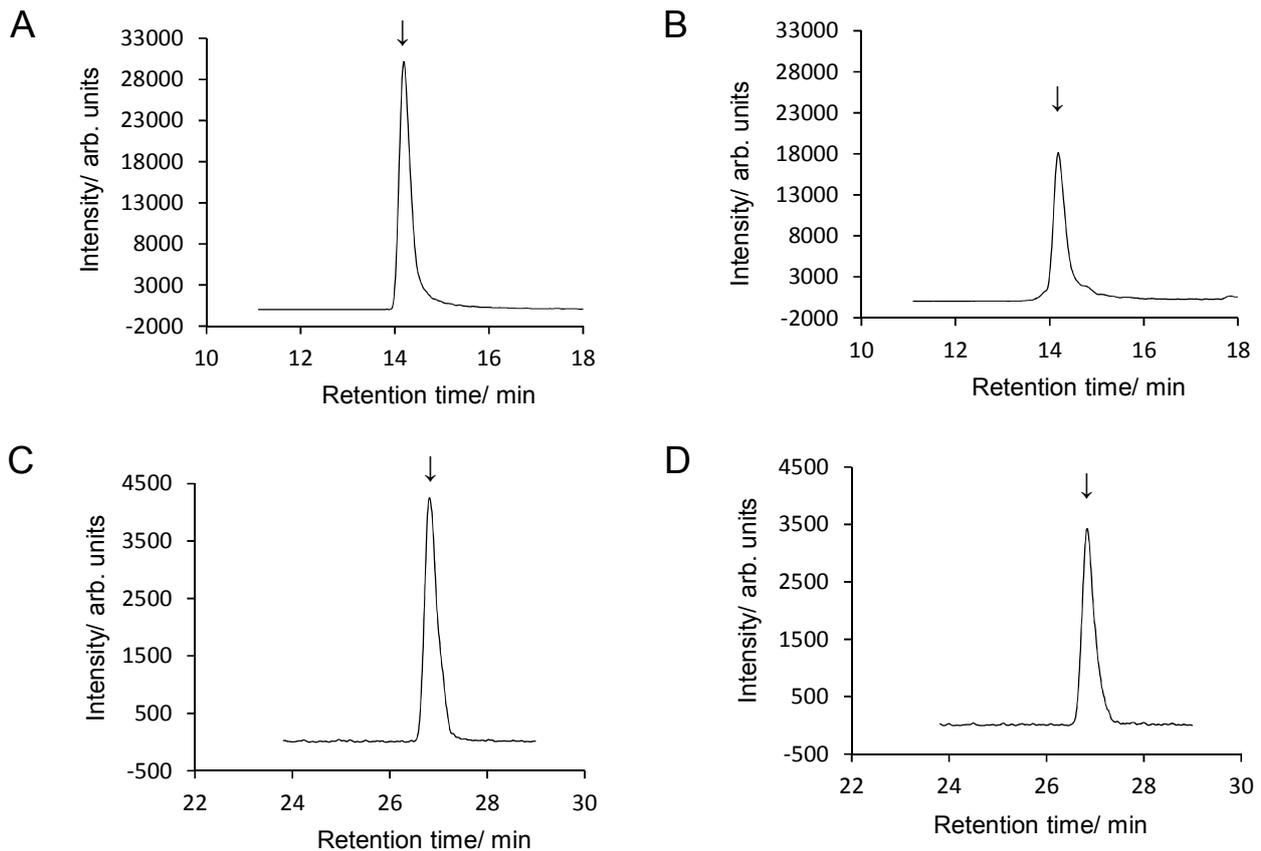


Fig. 5 SRM chromatograms of DON and ZEN

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 4 and 5. Arrows indicate the peaks of DON (A and B) and ZEN (C and D).)

A: Standard solution of DON (250 ng/mL: 2.5 ng as DON)

B: Sample solution of corn silage spiked at 1 mg/kg original matter of DON (167 ng/mL: 1.67 ng as DON)

C: Standard solution (5 ng/mL: 0.05 ng as ZEN)

D: Sample solution of corn silage spiked at 1 mg/kg original matter of ZEN (3.3 ng/mL: 0.033 ng as ZEN)

#### 4 まとめ

とうもろこしサイレージ中に含有される AFB<sub>1</sub>, DON 及び ZEN について, 飼料分析基準に従って試験を行ったところ, 以下の結果が得られた.

- 1) 飼料分析基準への収載を念頭においた分析法の検討については, 飼料分析基準に規定された方法で調製した分析用試料を用いることとした.
- 2) DON 及び ZEN について, 飼料分析基準をとうもろこしサイレージに適用しようとする場合には, 試料採取量や抽出溶媒量について改良の必要性が示唆された.

- 3) AFB<sub>1</sub> について、いずれの分析方法において得られたクロマトグラムについても、定量を妨げるピークは認められなかった。DON については、全ての試料において得られた SRM クロマトグラムに DON の定量を妨害するピークが認められたため、とうもろこしサイレージに適用しようとする場合は、選択性についての分析法の改良が必要であった。ZEN については、得られた SRM クロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 4) 風乾したとうもろこしサイレージに AFB<sub>1</sub> として 0.02 mg/kg 相当量を添加し、TFA 法及び PR 法に従って、添加回収試験を 3 点併行で実施し、回収率及び繰返し精度を求めた結果、いずれの方法も妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たした。また、同様に DON 及び ZEN として 2 mg/kg 相当量を添加し、一斉法に従って添加回収試験を 3 点併行で実施し、回収率及び繰返し精度を求めた結果、いずれの成分も妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たした。

## 文 献

- 1) 平岡 久明：飼料中のマイコトキシン汚染状況，臨床獣医，25 (6), 10-17 (2007).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 27 年度生産資材安全確保対策事業「国産飼料中のかび毒含有実態調査委託事業」報告書，平成 28 年 3 月 (2016).

## 技術レポート

## 7 飼料を対象とするサルモネラ試験法の選択増菌培地液量の減量化に関する検討

奥村 寿章<sup>\*1</sup>, 加藤 まどか<sup>\*2</sup>, 関口 好浩<sup>\*1</sup>, 三枝 尚子<sup>\*3</sup>, 宮野谷 杏<sup>\*1</sup>,  
名塚 英一<sup>\*4</sup>, 内山 丈<sup>\*5</sup>, 千原 哲夫<sup>\*6</sup>, 橋本 亮<sup>\*1</sup>

Improvement of Selective Enrichment for Detection Method of Salmonella in Feed  
~ Reduction of the Volume of Selective Enrichment Broth ~

Toshiaki OKUMURA<sup>\*1</sup>, Madoka KATO<sup>\*2</sup>, Yoshihiro SEKIGUCHI<sup>\*1</sup>,  
Naoko SAEGUSA<sup>\*3</sup>, Kyou MIYANOYA<sup>\*1</sup>, Eiichi NAZUKA<sup>\*4</sup>,  
Takeshi UCHIYAMA<sup>\*5</sup>, Tetsuo CHIHARA<sup>\*6</sup> and Sayaka HASHIMOTO<sup>\*1</sup>

(\*<sup>1</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

<sup>\*2</sup> Nagoya Regional Center, FAMIC

<sup>\*3</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Sendai Regional Center, FAMIC)

<sup>\*4</sup> Sendai Regional Center, FAMIC

<sup>\*5</sup> Fukuoka Regional Center, FAMIC

<sup>\*6</sup> Kobe Regional Center, FAMIC)

The Japanese official method for detection of *Salmonella* in feed was compared with a compactified method in the selective enrichment stage.

Apart from selective enrichment, analytical procedures in both methods were the same. The volume of selective enrichment broth in the official method was 100 mL, and the volume in the compactified method was scaled down to 10 mL. For Hajna tetrathionate broth of the official method and the compactified method, 10 mL and 1 mL of inoculum were inoculated respectively. Similarly, for Rappaport-Vassiliadis enrichment broth of the official method and the compactified method, 10 mL and 0.1 mL of inoculum were inoculated respectively. The ratio of inoculation volume to selective enrichment broths volume was changed in Rappaport-Vasiliadis enrichment broth, but it was not changed in Hajna tetrathionate broth.

In a comparative study using feed samples that had been found naturally contaminated by *Salmonella*, 11 out of 20 samples were *Salmonella* positive (55.0 %) with both methods, and all results matched. A comparative study on routinely inspected feed showed that 4 of 102 samples were *Salmonella* positive (3.9 %) with both methods, and all results matched.

These results demonstrated that the compactified method is an acceptable alternative to the official method.

\*1 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

\*2 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

\*3 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 仙台センター

\*4 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

\*5 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

\*6 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

Key words: *Salmonella*; selective enrichment broth; feed; harmonization of testing method; validation test

キーワード：サルモネラ；選択増菌培地；飼料；検査法の調和；妥当性確認試験

## 1 緒言

サルモネラは家畜、家きん及びペット等の腸管内をはじめ、河川や下水等自然界に広く分布している細菌であり、その一部は病原性の高さから家畜衛生や公衆衛生上の大きな問題となっている。家畜等の飼養面において、サルモネラに汚染された飼料が給与された場合、腸管感染が成立する可能性があり、更に腸管内で増殖したサルモネラを含む糞便は、飼育環境を汚染することにより、同居動物や飼育者への感染源となりうる。また、保菌動物をと畜する際に食肉等が汚染された場合、ヒトの食中毒の原因にもなりうる<sup>1)</sup>。このため、飼料の生産、流通段階における飼料安全対策の一環として、飼料のサルモネラ試験の実施は重要である。

飼料及びペットフードを対象としたサルモネラの試験法は、我が国においてはそれぞれ飼料分析基準<sup>2)</sup>収載法（以下「飼料公定法」という。）及び愛玩動物用飼料等の検査法<sup>3)</sup>収載法（以下「ペットフード公定法」という。）が公定法として用いられている。また、飼料や食品等を対象としたサルモネラの試験法は国内外に数多く存在している（Table 1）<sup>2-10)</sup>。近年、我が国では食品からの微生物検査標準法検討委員会が中心となって、複雑化した食品を対象とするサルモネラ試験法（培養法）<sup>11)</sup>の調和を図るべく、ISO 6579 の試験法<sup>6)</sup>との互換性を考慮して検討<sup>12)</sup>した標準試験法<sup>4)</sup>が公定法に採用されている。一方、飼料公定法及びペットフード公定法と他の試験法を比較すると、特にサルモネラを選択的に増菌培養する条件が異なっており、Table 1 に示したとおり両公定法の培地の液量及びこれに接種する前増菌培地の液量が他の試験法よりも多く規定されている。この培地液量が他の試験法と同程度に減量できれば、検査コストの削減はもとより廃棄物の排出抑制によって環境への負荷低減効果が期待できる。

そこで、選択増菌培養条件について、過去の飼料を対象とした調査でサルモネラの汚染が確認された試料を用い、培地液量及び前増菌培養液の接種量を減量化した試験法について、飼料分析基準への適用の可否を検討した。更に平成 28 年度に飼料製造事業場で採取した飼料についても同様に検討した。

## 2 実験方法

### 2.1 試料

#### 1) サルモネラ汚染試料

過去の調査でサルモネラ汚染が確認され、冷蔵（4℃）保管している 20 検体を用いた。その内訳は、配合飼料 4 検体、混合飼料 1 検体及び飼料原料 15 検体である。なお、これらの試料は平成 17 年 7 月から平成 27 年 3 月までの間に採取したもので、全て自然汚染に由来するものである。

#### 2) 平成 28 年度比較検討用試料

平成 28 年 4 月から平成 29 年 2 月までの期間に、国内の飼料製造事業場から採取した飼料 102 検体を用いた。その内訳は、配合飼料 43 検体、混合飼料 5 検体及び飼料原料 54 検体である。なお、試料は冷蔵（4℃）保管とした。

Table 1 Selective enrichment in domestic and international testing methods of *Salmonella*

Method	Sample	Selective enrichment		
		Type	Volume (mL)	Inoculation (mL)
Analytical standards of feeds <sup>2)</sup> (Official method in Japan)	Feed	HTT	100	10
		RV	100	10
Analytical standards of pet foods <sup>3)</sup> (Official method in Japan)	Pet food	HTT	100	10
		RV	100	10
MHLW <sup>4)</sup>	Food	TT	10	1
		RV	10	0.1
Japanese Pharmacopoeia <sup>5)</sup>	Medical and pharmaceutical product	RV	10	0.1
ISO 6579 <sup>6)</sup> , JIS K 3705 <sup>7)</sup>	Food, feed	MKTTn	10	1
		RVS	10	0.1
FDA/BAM <sup>8)</sup>	Food, partial pet food, environmental sample	TT	10	1
		RV	10	0.1
FDA/BAM <sup>9)</sup>	Environmental sample in poultry house	HTT	10	1
		RV	10	0.1
AOAC 995.20 <sup>10)</sup>	Highly contaminated raw foods and animal feed	TT with BG	10	1
		RV	10	0.1

HTT: Hajna-tetrathionate broth, RV: Rappaport-Vassiliadis broth, TT: Tetrathionate broth, MKTTn: Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth, RVS: Rappaport-Vassiliadis soya peptone broth, BG: Brilliant green

## 2.2 試薬

- 1) 水は AQUARIUS (東洋製作所製), Elix Essential 5 (Millipore 製), DIRECT-Q UV3 (Millipore 製) 及び純水製造装置ピュアライン WL220 型 (ヤマト科学製) により精製した精製水を用いた。
- 2) 界面活性剤溶液, ヨウ素・ヨウ化カリウム溶液, 生理食塩液及び緩衝ペプトン水は, 飼料公定法<sup>2)</sup>に記載のとおり調製した。なお, 調製に用いた試薬は, 等級があるものは特級を用いた。また, 以下の市販の既成培地を用いた。

ハーナ・テトラチオン酸塩培地 (ハーナ・テトラチオン酸塩基礎培地 “栄研”, 栄研化学製, 以下「HTT 培地」という。)

ラポポート・バシリアデイス培地 (RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV) ENRICHMENT BROTH, Oxoid 製, 以下「RV 培地」という。)

DHL 寒天培地 (パールコア DHL 寒天培地 “栄研”, 栄研化学製)

ブリリアントグリーン寒天培地 (Difco Brilliant Green Agar, Becton, Dickinson and Company 製, 以下「BG 寒天培地」という。)

クロモアガーサルモネラ寒天培地 (CHROMagar Salmonella, CHROMagar 製, 以下「CAS 寒天培地」という。)

TSI 寒天培地 (パールコア TSI 寒天培地 “栄研”, 栄研化学製)

SIM 寒天培地 (SIM 培地 “栄研”, 栄研化学製)

リジン脱炭酸試験用培地 (リジン脱炭酸試験用培地 “栄研”, 栄研化学製, 以下「LD 培地」という。)

3) O 群の決定には、サルモネラ免疫血清「生研」（デンカ生研製）を用いた。

### 2.3 装置及び器具

- 1) インキュベーター：庫内温度を 37~42 °C（管理精度：±1 °C）に設定できるものを用いた。
- 2) ペトリ皿：内径 90 mm，高さ 20 mm のものを用いた。
- 3) 白金耳：材質はニクロム製とし，2.4 の 1) で定義する選択分離培養には直径 3 mm のものを，2.4 の 1) で定義する純粋分離培養には直径 2 mm のものを用いた。なお，直径 3 mm の 1 白金耳の採取量は，2.5~3.0 µL の範囲とした。
- 4) その他：試験に用いた器具のうち，培地及び菌液に接触するものは，滅菌済みのものを用いた。

### 2.4 試験方法等

#### 1) サルモネラの検出方法

飼料公定法並びに飼料公定法の選択増菌培養液の量及びこれに接種する前増菌培養液量を減量した方法（以下「減量化法」という。）は，それぞれ以下の手順による。

##### i 飼料公定法

緩衝ペプトン水に試料 25 g を加えて増菌培養（37 °C，18~24 時間）（前増菌培養）し，得られた培養液 10 mL を HTT 培地（液量 100 mL）及び RV 培地（液量 100 mL）にそれぞれ接種し，サルモネラを選択的に増菌培養（42 °C，18~24 時間）（選択増菌培養）した。得られた各選択増菌培養液各 1 白金耳を DHL 寒天培地，BG 寒天培地及び CAS 寒天培地にそれぞれ画線塗抹し，サルモネラを選択的に培養（37 °C，18~24 時間）（選択分離培養）した。各培地において，サルモネラと疑われる集落が検出された場合は単離（純粋分離培養）し，TSI 寒天培地，SIM 寒天培地及び LD 培地を用いて培養（37 °C，18~24 時間）（確認培養）後，その性状を確認した。サルモネラと疑われる性状であった場合は，TSI 培地の斜面部に培養された菌を用いて O 抗原の免疫血清との凝集反応を確認した。凝集が認められた場合は，サルモネラ検出と判定した。それ以外の場合，平成 28 年度比較検討用試料はサルモネラ不検出と判定し，サルモネラ汚染試料は iii の遅延二次増菌培養を実施した。

##### ii 減量化法

緩衝ペプトン水に試料 25 g を加えて前増菌培養（37 °C，18~24 時間）し，得られた培養液 1 mL を HTT 培地（液量 10 mL）に，0.1 mL を RV 培地（液量 10 mL）にそれぞれ接種しサルモネラを選択的に増菌培養（42 °C，18~24 時間）した。これ以降の手順及びサルモネラ判定基準は，飼料公定法と同様とした。

##### iii 遅延二次増菌培養

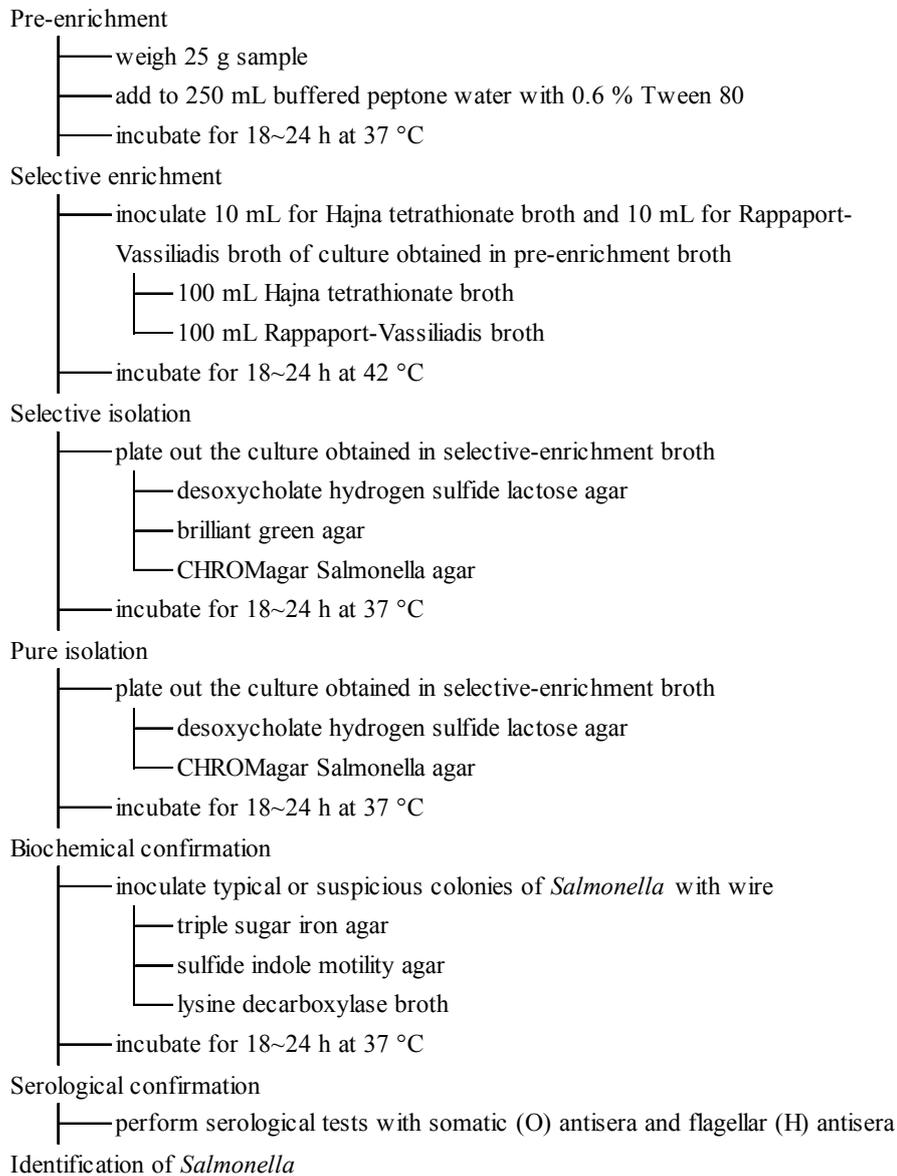
サルモネラ汚染試料を用いた検討において，選択分離培養を終えた培地でサルモネラと疑われる集落が認められなかった場合，確認培養でサルモネラと疑われる性状でなかった場合及び O 抗原の免疫血清との凝集反応で凝集が認められなかった場合，遅延二次増菌培養<sup>13)</sup>により追加試験をすることとした。その方法は，選択増菌培養後の HTT 培養液を更に 25 °C で 7 日間延長培養し，この培養液について，HTT 培地を用いて減量化法の培養条件で再試験を行い，検出された菌と免疫血清との凝集が認められた場合にサルモネラ検出，それ以外はサルモネラ不検出と判定した。

## 2) 実施試験室

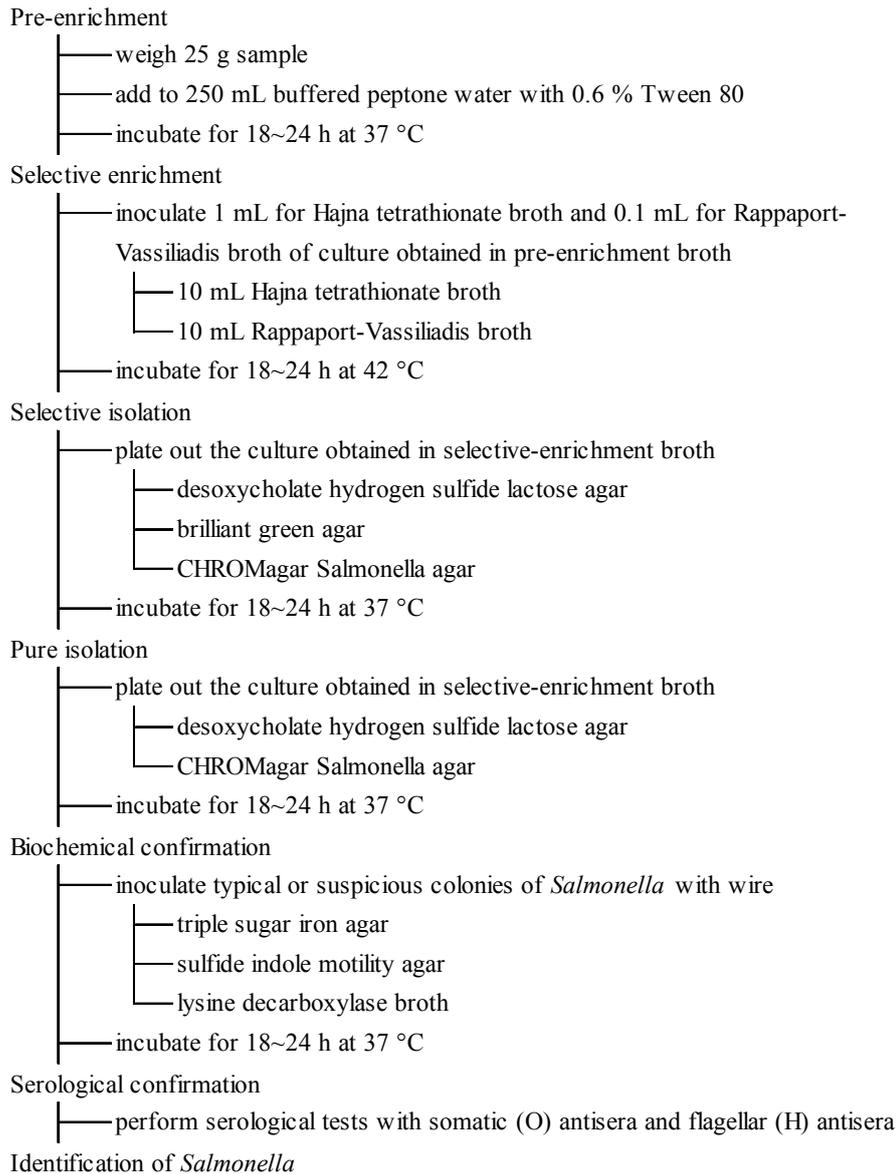
サルモネラ汚染試料を用いた検討は本部で実施した。平成 28 年度の比較検討は、本部並びに仙台、神戸及び福岡センターで実施した。

## 3) 分析法の概要

飼料公定法及び減量化法の概要をそれぞれ Scheme 1 及び 2 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for *Salmonella* in official method of feeds



Scheme 2 Analytical procedure for *Salmonella* in compactified method

### 3 結果及び考察

サルモネラ汚染試料を用いて、選択増菌培地の液量及びこれに接種する前増菌培養液量の減量がサルモネラの検出に及ぼす影響を検討した。その結果、全 20 検体のうち、飼料公定法、減量化法ともに共通した 11 検体でサルモネラ検出、9 検体でサルモネラ不検出と判定された (Table 2)。検出と判定された試料は、全ての選択増菌培養液 (HTT 培地及び RV 培地) から塗抹した全ての選択分離培地 (DHL 寒天培地、BG 寒天培地及び CAS 寒天培地) でサルモネラを疑う集落が検出された。選択分離培養、性状確認でサルモネラが検出されなかった 9 検体は、更に遅延二次増菌培養を行い、不検出であることを確認した。この結果から、減量化法は飼料公定法と同等の精度でサルモネラを検出できることが見込まれたため、さらに平成 28 年度に飼料製造事業場で採取した飼料について比較検討することとした。なお、過去の試験でサルモネラが検出されたものが本比較試験で検出されなかった理由は、長期の冷蔵保管によりサルモネラが死滅したためと推定された。

Table 2 Detection of *Salmonella* from naturally contaminated feed<sup>a)</sup>  
in official method of feeds and compactified method<sup>b)</sup>

Kind of feed	Number of samples			Number of samples of identical judgement in both methods
	Examined	Detected	Not detected	
Formula feed				
For poultry	2	1	1	2
For swine	1		1	1
For cattle	1		1	1
Subtotal	4	1	3	4
Mixed feed				
from animal matter	1		1	1
Subtotal	1		1	1
Feed ingredient				
Soybean meal	2	1	1	2
Poultry by-product meal	2	1	1	2
Fish meal	8	5	3	8
Meat and bone meal <sup>c)</sup>	2	2		2
Feather meal	1	1		1
Subtotal	15	10	5	15
Total	20	11	9	20

- a) The feed samples used in this study were once determined to be *Salmonella*-positive by the official method in the period from July 2005 to March 2015.
- b) The method which reduced the volume of selective enrichment broth and pre-enrichment inoculation on the selective enrichment
- c) All samples were derived from pork and poultry.

平成 28 年度比較検討用試料を用い、同様に検討した結果、全 102 検体のうち、4 検体でサルモネラ検出、98 検体でサルモネラ不検出と判定された (Table 3) . 試料ごとの検出又は不検出の判定は、両試験法で一致していた。検出と判定された試料は、両試験法で全ての選択増菌培養液 (HTT 培地及び RV 培地) からサルモネラを疑う集落が検出された (Table 4) .

Table 3 Detection of *Salmonella* from routinely inspected samples  
in official method of feeds and compactified method

Kind of feed	Number of samples			Number of samples of identical judgement in both methods
	Examined	Detected	Not detected	
Formula feed				
For poultry	14		14	14
For swine	11	2	9	11
For cattle	17	1	16	17
For fish	1		1	1
Subtotal	43	3	40	43
Mixed feed				
containing animal matter	4		4	4
of plant origin	1		1	1
Subtotal	5		5	5
Feed ingredient				
Defatted rice bran	2		2	2
Corn gluten feed	1		1	1
Wheat bran	7		7	7
Barley bran	1		1	1
Sesami meal	1		1	1
Corn gluten meal	1		1	1
Soybean meal	1		1	1
Rapeseed meal	1		1	1
Poultry by-product meal	10		10	10
Fish meal	21	1	20	21
Meat and bone meal <sup>a)</sup>	3		3	3
Feather meal	5		5	5
Subtotal	54	1	53	54
Total	102	4	98	102

a) Two samples were derived from pork and poultry, and the other one was derived from pork.

Table 4 Results of selective isolation on *Salmonella*-detected routinely inspected samples  
in official method of feeds and compactified method

No.	Kind of feed	Official method						Compactified method					
		HTT			RV			HTT			RV		
		DHL	BG	CAS	DHL	BG	CAS	DHL	BG	CAS	DHL	BG	CAS
1	Formula feed for cattle	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
2	Formula feed for swine	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
3	Formula feed for swine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Fish meal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

HTT: Hajna-tetrathionate broth, RV: Rappaport-Vassiliadis broth, DHL: Desoxycholate hydrogen sulfide lactose agar, BG: Brilliant green agar, CAS: CHROMagar Salmonella agar, +: detection of typical colony suspected as *Salmonella*, -: absence of typical colony suspected as *Salmonella*

国内外の主なサルモネラ試験法（培養法）における選択増菌培地には、HTT 培地、テトラチオネート培地、ミュラー・カウフマン・テトラチオネート・ノボビオシン培地、RV 培地及びラポポート・バシリアディス・ソーヤペプトン培地（以下「RVS 培地」と言う。）等が用いられている。試験法は異なるが、選択増菌培地液量は 10 mL に調和されており、テトラチオン酸塩を選択剤としている選択増菌培地に接種する前増菌培養液量は 1 mL、RV 培地及びそれを改良した RVS 培地に接種する前増菌培養液量は 0.1 mL に調和されている<sup>4-10)</sup> (Table 1)。Vassiliadis らによると、食品、糞便及び環境汚水を試料とした場合、RV 培地における選択増菌培地液量と前増菌培養液の接種量の関係は、選択増菌培地液量と接種量が 10 mL : 0.1 mL と 100 mL : 0.1 mL では前者のサルモネラの検出率が高く、選択増菌培地を 10 mL とした場合の 3 接種条件 (0.1 mL, 0.2 mL, 0.5 mL) では検出率に差はなかったと報告している<sup>14)</sup>。さらに、競合微生物の発育は培地量に対する接種量の割合が大きいほど盛んであることも明らかにしている<sup>14)</sup>。また、当センターが過去に実施した RV 培地及び RVS 培地の液量と接種量の割合に関する検討において、飼料公定法 (100 mL : 10 mL) とその 10 分の 1 (100 mL : 1 mL) の培養条件で増菌した培養液におけるサルモネラ菌数に差は認められていない<sup>15)</sup>。今回行った培地液量と接種量を 10 分の 1 (HTT 培地は 10 mL : 1 mL, RV 培地は 10 mL : 0.1 mL) に減量した比較試験においてもサルモネラの検出率に差は認められなかった。これらのことから、10~100 mL の培地液量の範囲で選択増菌培地と接種量の割合が同じであれば、培地液量の変更は可能であると考えられた。

他方、選択増菌培地の試薬量は現行の 10 分の 1 になることから、試験コストの大幅な削減が期待できる。また、RV 培地に含まれているマラカイトグリーンは、食品安全委員会による食品健康影響評価<sup>16)</sup>において、生物の健康リスクに懸念がある合成抗菌剤として、ヒトにおける発がんリスクは明確ではないが、げっ歯類における発がん性が示唆され、遺伝毒性も否定できないと評価されており、養殖水産動物への使用が禁止、食品において不検出と規定されている物質<sup>17)</sup>である。マラカイトグリーンを含む培地の使用量削減は、試験後の培地由来による廃棄物の減量につながり、環境負荷の低減に寄与することが期待できる。

以上のことから、減量化法は飼料公定法と同等のサルモネラ検出精度を有する試験法であり、加えて経済面や環境面からは、より優れた試験法であり、減量化法を飼料分析基準に採用することで、国内外におけるサルモネラ試験法との調和につながると考えられた。また、今回の比較試験は飼料を用いた検討であるが、試料を前増菌培養した後に行う選択増菌操作の選択増菌培養液量と接種する前増菌培養液の減量化であり、飼料公定法を基に検討されたペットフード公定法にも適用が可能と考えられた。

#### 4 まとめ

飼料を対象とするサルモネラ試験法（培養法）について、選択増菌培地の液量及びこれに接種する前増菌培養液の量を減量化について、飼料公定法への適用の可否を検討したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 過去にサルモネラ汚染が確認された試料 (20 検体) を用いて飼料公定法と減量化法とのサルモネラ検出状況を比較した結果、いずれの試験法とも 11 検体はサルモネラ検出、9 検体はサルモネラ不検出と判定され、この結果は両試験法で一致した。

- 2) 平成 28 年度に製造事業場で採取した飼料 (102 検体) を用いて飼料公定法と減量化法のサルモネラ検出状況を比較した結果, いずれの試験法とも 4 検体はサルモネラ検出, 98 検体はサルモネラ不検出と判定され, この結果は両試験法で一致した.

## 謝 辞

本試験の実施に当たり, ご助言いただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門, 秋庭正人博士に感謝の意を表します.

## 文 献

- 1) 中澤 宗生: 微生物の辞典, 東京, 朝倉書店, 252 (2008) (ISBN: 978-4254171365).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知: 飼料分析基準の制定について, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).
- 3) 農林水産消費安全技術センター理事長通知: 愛玩動物用飼料等の検査法の制定について, 平成 21 年 9 月 1 日, 21 消技第 1764 号 (2009).
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 食品, 添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について, 平成 27 年 7 月 29 日, 食安発 0729 第 4 号 (2015).
- 5) 厚生労働省医薬・生活衛生局長通知: 第十七改正日本薬局方の制定等について, 平成 28 年 3 月 7 日, 食安発 0307 第 3 号 (2016).
- 6) ISO 6579: Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. (2002)/ Amd (2007).
- 7) 日本工業規格: 培地の試験方法-サルモネラ属菌用培地-サルモネラ属菌の検出, JIS K 3705(2008).
- 8) U.S. Food and Drug Administration: FDA/BAM. Biological analytical method Chapter 5, <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>, cited 16 Dec. 2016.
- 9) U.S. Food and Drug Administration: FDA/BAM. Environmental sampling and detection *Salmonella* in poultry houses, <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114716.htm>, cited 10 Jan. 2017.
- 10) AOAC Official method of analysis: *Salmonella* in raw, highly contaminated foods and poultry feed. 995.20. 2012.
- 11) 浅尾 努, 河合 高生, 久米田 裕子, 寺本 忠司, 石黒 厚, 梅迫 誠一, 小笠原 準, 高須 一重, 美野 朋隆, 日野 亮一, 斉藤 利江, 小崎 俊司, 山本 茂貴: 食品の細菌学的試験法の現状と問題点, 日本食品微生物学会雑誌, **24**, 134-143 (2007).
- 12) 国立医薬品食品衛生研究所: サルモネラ属菌標準試験法 NIHSJ-01-ST4, [http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/pdf/protocol/NIHSJ-01\\_ST4\\_rev03.1.pdf](http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/pdf/protocol/NIHSJ-01_ST4_rev03.1.pdf), cited 18 Jan. 2017.
- 13) 盛田 隆行, 北澤 秀基, 村本 靖之: 飼料および食品製造施設で用いるサルモネラ属菌分離のための遅延二次増菌培養法の評価, 日本食品微生物学会雑誌, **27**, 21-26 (2010).
- 14) Vassiliadis P, Mavrommati C, Kalapothaki V, Chronas G and Efstratiou M: *Salmonella* isolation with Rappaport-Vassiliadis enrichment medium seeded with different sized inocula of pre-enrichment cultures of meat products and sewage polluted water, J. Hyg. Camb., **95**, 139-147 (1985).

- 15) 千原 哲夫, 田中 里美, 八木 寿治 : 飼料中のサルモネラ検査に用いる選択増菌培地の検討, 日本食品微生物学会雑誌, **28**, 175-185 (2011).
- 16) 内閣府食品安全委員長通知 : MG および LMG の食品健康影響評価について 別添, 平成 17 年 11 月 24 日, 府食第 1140 号 (2005).
- 17) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 : 食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件について, 平成 18 年 5 月 30 日, 食安発 0530001 号 (2006).

**精度管理****1 平成 28 年度飼料等の共通試料による分析鑑定について****Proficiency Test (in the Fiscal Year 2016)**

鈴木 知華<sup>\*1</sup>, 船水 悦子<sup>\*2</sup>, 新井 詠子<sup>\*3</sup>,  
加藤 まどか<sup>\*4</sup>, 安田 紗紀恵<sup>\*5</sup>, 矢野 愛子<sup>\*6</sup>

**1 目 的**

飼料検査指導機関, 飼料・飼料添加物製造等業者, 民間分析機関等を対象に, 飼料等の共通試料による分析鑑定を行うことにより, 分析及び鑑定技術の維持向上を図り, 併せて分析誤差を把握し, 飼料等の適正な製造及び品質管理の実施に資する。

**2 共通試料の内容**

A 試料	肉用牛肥育用配合飼料
B 試料	魚 粉
C 試料	鑑定用飼料原料混合試料
D 試料	ほ乳期子豚育成用プレミックス

**3 共通試料の調製**

## 3.1 調製年月日

平成 28 年 6 月 23 日及び 6 月 24 日

## 3.2 調製場所

独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

## 3.3 調製方法

## 1) A 試料

1 mm のスクリーンを装着した粉砕器で粉砕した肉用牛肥育用配合飼料 80 kg を用い, 以下の手順により試料を調製した。

試料をよく混合した後, 9 等分した。その中の 4 区画を一つに合わせてよく混合した後, 4 等分して元に戻した。この操作を表 1 の混合区画表により 7 回繰り返した後, 各区画より一定量 (約 20 g) ずつとり, 1 袋当たり約 180 g 入りの試料 380 個を調製した。

\*1 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

\*2 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

\*3 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

\*4 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

\*5 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター, 現 肥飼料安全検査部

\*6 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

表 1 混合区画表

回数	I	II	III	IV	V	VI	VII
	8	7	4	8	7	7	5
区画番号	1	6	8	2	9	6	4
	6	3	5	1	5	3	2
	9	4	1	3	2	9	6

## 2) B 試料

1 mm の網ふるいを通過した魚粉 80 kg を用い、A 試料と同様に試料 380 個を調製した。

## 3) C 試料

各原料中の夾雑物を除去した後、必要に応じて粉碎し、表 2 に示した 10 種類の原料を同表の混合割合で混ぜ合わせた試料（総量 80 kg）を用い、A 試料と同様に試料 380 個を調製した。

表 2 C 試料の原料及びその混合割合

原料名	混合割合 (%)	原料名	混合割合 (%)
とうもろこし	35	なたね油かす	7
マイロ	17	魚粉	3
小麦	10	アルファルファミール	3
米ぬか油かす	10	炭酸カルシウム	3
ごま油かす	10	食塩	2

## 4) D 試料

ほ乳期子豚育成用プレミックス 80 kg を用い、A 試料と同様に試料 380 個を調製した。

## 4 分析鑑定項目及び実施要領

## 4.1 分析鑑定項目

A 試料・・・水分，粗たん白質，粗脂肪，粗繊維，粗灰分，カルシウム，リン及びモネンシンナトリウム

B 試料・・・水分，粗たん白質，粗灰分，カドミウム及びエトキシキン

C 試料・・・飼料原料の検出及びその混合割合の推定

D 試料・・・銅，亜鉛及びクエン酸モランテル

## 4.2 実施要領

「平成 28 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」（135 ページ）による。

## 5 共通試料の均質性確認

A 及び B 試料では粗たん白質及び粗灰分，D 試料では銅及び亜鉛の分析によって，Thompson らの harmonized protocol<sup>1)</sup>に基づき，各試料の均質性を確認した。

ランダムに抜き取った 10 袋で各 2 点併行分析した結果を表 3 に，また，その結果に基づく一元配置の分散分析結果を表 4 に示した。

いずれの試料においても，分散比  $F_0$  は  $F$  境界値を下回り，有意水準 5 %において試料間に有意

な差は認められず、試料の均質性に問題はないと判断した。

表 3 A, B 及び D 試料の分析結果

試料 No.	A試料				B試料				D試料			
	粗たん白質 (%)		粗灰分 (%)		粗たん白質 (%)		粗灰分 (%)		銅 (g/kg)		亜鉛 (g/kg)	
	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2
1	12.78	12.61	3.16	3.12	66.51	66.50	16.14	16.01	31.35	31.18	29.78	29.44
2	12.51	12.56	3.16	3.16	66.40	65.70	16.11	16.11	31.56	31.76	29.46	29.76
3	12.93	12.66	3.16	3.10	66.19	66.01	15.96	15.97	31.31	31.34	29.28	29.56
4	13.23	12.49	3.13	3.12	66.18	65.99	16.08	15.97	31.12	31.28	29.77	29.84
5	12.78	12.94	3.19	3.15	66.81	66.41	16.08	16.03	31.48	31.34	29.63	29.42
6	12.66	12.54	3.12	3.12	66.84	66.08	16.01	15.96	31.29	31.47	29.55	29.68
7	12.51	12.88	3.19	3.18	66.00	66.97	16.23	15.95	31.17	31.19	28.80	29.33
8	12.78	12.55	3.16	3.15	66.05	65.98	15.91	15.90	31.40	31.09	29.73	29.73
9	12.53	12.82	3.19	3.12	66.43	66.48	16.03	16.11	30.76	31.42	28.65	29.44
10	12.59	12.56	3.11	3.17	66.19	66.68	15.95	16.02	31.20	31.23	29.37	29.13

表 4 A, B 及び D 試料の分散分析結果

成分名	要因	偏差平方和 $S$	自由度 $\phi$	不偏分散 $V = S/\phi$	分散比 $F_0 = V_A/V_E$	F 境界値 $F (\alpha = 0.05)$
A試料	試料間 A	0.2314	9	0.0257	0.54	3.02
	粗たん白質 分析誤差 E	0.4754	10	0.0475		
	総計 T	0.7068	19			
	粗灰分					
B試料	A	0.0077	9	0.0009	1.10	3.02
	E	0.0078	10	0.0008		
	T	0.0155	19			
	粗たん白質					
D試料	A	0.9343	9	0.1038	0.84	3.02
	E	1.2413	10	0.1241		
	T	2.1755	19			
	銅					
D試料	A	0.0924	9	0.0103	1.60	3.02
	E	0.0640	10	0.0064		
	T	0.1565	19			
	亜鉛					
D試料	A	0.4572	9	0.0508	1.49	3.02
	E	0.3402	10	0.0340		
	T	0.7974	19			
	亜鉛					
D試料	A	1.2771	9	0.1419	2.16	3.02
	E	0.6563	10	0.0656		
	T	1.9334	19			
	亜鉛					

## 6 参加試験室

- 6.1 総数 230
- うち 飼料検査指導機関…43
  - 飼料製造業者関係…157
  - 飼料添加物製造業者関係…8
  - 民間分析機関等…22
- 6.2 試料別参加試験室数
- A 試料…225
  - B 試料…221
  - C 試料…123
  - D 試料…74

## 7 分析成績及び解析結果並びに鑑定成績

### 7.1 分析成績及び解析結果

A, B 及び D 試料について, その分析成績を表 5 に, ヒストグラムを図 1 に, また, 解析結果を表 6~8 に示した.

分析値の解析は, ロバスト法に基づき以下の手順により行った.

式 1 により頑健な標準偏差の推定量として NIQR (Normalised inter quartile range; 標準四分位範囲) を求めた後, 式 2 により各分析値の  $z$ -スコアを求めた. なお, 各四分位数は, 表計算ソフトウェア Microsoft Excel の関数 QUARTILE.INC を用いて求めた.

$$\text{NIQR} = \frac{(c-a)}{1.349} \dots\dots\dots \text{式 1}$$

$a$ : 第 1 四分位数

$c$ : 第 3 四分位数

$$z\text{-スコア} = \frac{(x-b)}{\text{NIQR}} \dots\dots\dots \text{式 2}$$

$x$ : 各試験室の分析値

$b$ : 中央値

また,  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上の分析値を異常値と判断し, これを棄却した後, 平均値の 95 %信頼区間を求めた.

### 7.2 鑑定成績

C 試料について, その鑑定成績を表 9 及び 10 に示した.





表 5 A, B 及び D 試料

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		MN(管理分析法) 分析値 No. z-score (g(力価)/t)	MN(飼料分析基準) 分析値 No. z-score (g(力価)/t)	
	分析値 (%)	No. z-score															
87	11.33	1 -4.03	12.61	2 0.10	3.18	1 -0.20	4.81	3 1.03	3.19	1 0.29	0.206	2 -1.49	0.465	1 -1.34			
88	12.19	1 0.14	12.28	1 -1.60	3.24	1 0.20	4.44	1 -0.02	3.16	1 -0.14			0.482	1 0.41			
89	12.27	1 0.53															
90	12.25	1 0.43	11.91	3 -3.52	3.25	1 0.26	4.00	2 -1.29	3.02	1 -2.24							
90			12.75	4 0.83													
91			12.80	3 1.08	3.21	2 0.00	4.86	3 1.17									
92	12.22	1 0.29	12.58	3 -0.05	3.09	2 -0.80	4.68	3 0.66	3.10	1 -1.04	0.291	2 1.60	0.474	1 -0.41	29.0	2 -1.38	
94	12.17	1 0.04	12.35	4 -1.24	3.28	1 0.47	4.07	2 -1.09	3.17	1 0.00	0.253	2 0.21	0.486	1 0.83			
97	12.30	1 0.68	12.62	1 0.15	3.23	1 0.13	4.11	2 -0.97	3.12	1 -0.74	0.241	2 -0.21	0.482	1 0.41			
99	12.22	1 0.29	12.49	4 -0.51	3.40	1 1.28			3.31	1 2.09	0.250	2 0.10	0.482	1 0.41			
100	12.17	1 0.04	12.40	2 -0.98	3.37	1 1.07	4.11	2 -0.97	3.20	1 0.44	0.252	2 0.18	0.478	1 0.00	29.8	1 -0.80	
100															26.6	3 -0.18	
101	12.03	1 -0.63	12.66	3 0.36	3.20	2 -0.06	4.18	2 -0.77	3.34	1 2.54	0.280	2 1.20	0.497	1 1.97	31.5	2 0.43	
102	12.14	1 -0.09	12.70	4 0.57	3.13	2 -0.53	4.36	2 -0.25	3.15	1 -0.29	0.254	2 0.25	0.405	1 -7.57	28.3	4 0.88	
104	12.30	1 0.68	12.43	4 -0.83	3.12	2 -0.60			3.18	1 0.14	0.244	2 -0.10	0.480	1 0.20	31.1	3 2.66	
105	12.18	1 0.09	12.44	3 -0.77	3.04	1 -1.14	4.64	2 0.54	3.16	1 -0.14							
106			12.49	3 -0.51													
108	12.02	1 -0.68	12.41	3 -0.93	3.37	1 1.07			3.13	1 -0.59	0.230	2 -0.61	0.470	1 -0.83			
109	12.35	1 0.92	12.80	3 1.08					3.30	1 1.94	0.247	2 0.00	0.474	1 -0.41			
110	11.63	1 -2.57	12.71	3 0.62	3.26	1 0.33			3.45	1 4.19	0.256	2 0.32	0.480	1 0.20	25.2	3 -1.07	
111	12.30	1 0.68	12.54	3 -0.25	3.38	2 1.14	4.42	2 -0.08	3.26	1 1.34	0.288	2 1.49	0.471	1 -0.72	28.7	3 1.14	
112	12.34	1 0.87	12.73	2 0.72	3.19	1 -0.13	4.06	1 -1.11	3.21	1 0.59	0.247	2 0.00	0.475	1 -0.31			
113	12.16	1 0.00	12.50	3 -0.46	2.97	1 -1.61	4.35	2 -0.28	3.16	1 -0.14	0.225	2 -0.80	0.476	1 -0.20	30.6	1 -0.21	
114	12.06	1 -0.48							3.33	1 2.39	0.288	2 1.49	0.479	1 0.10		30.6	4 2.34
115	12.12	1 -0.19	12.65	3 0.31	3.26	1 0.33	4.70	3 0.71	3.11	1 -0.89	0.219	2 -1.02	0.455	1 -2.38	26.7	3 -0.12	
116	12.03	1 -0.63	12.52	3 -0.36	3.29	1 0.53	4.56	2 0.31	3.20	1 0.44	0.296	1 1.78	0.516	1 3.94	27.2	1 -2.69	
117	12.48	1 1.55	12.41	3 -0.93	3.21	2 0.00			3.12	1 -0.74							
119	12.08	1 -0.38	12.77	3 0.93	3.12	2 -0.60	3.77	2 -1.95	3.23	1 0.89	0.231	2 -0.58	0.475	1 -0.31	24.4	3 -1.58	
120	12.19	1 0.14	12.63	3 0.20	3.30	1 0.60	4.16	3 -0.83	3.17	1 0.00	0.229	2 -0.65	0.477	1 -0.10	26.9	3 0.00	
121	12.17	1 0.04	12.74	3 0.77	3.28	1 0.47	4.26	2 -0.54	3.15	1 -0.29	0.271	1 0.87	0.475	1 -0.31			
122	12.08	1 -0.38	12.54	3 -0.25	3.20	1 -0.06	4.51	2 0.17	3.11	1 -0.89	0.250	2 0.10	0.477	1 -0.10			
124	12.19	1 0.14	12.64	3 0.25	3.36	1 1.01	4.81	3 1.03	3.31	1 2.09	0.280	2 1.20	0.506	1 2.90	30.4	1 -0.36	
125	12.39	1 1.11	12.55	3 -0.20	3.44	1 1.55	4.67	3 0.63	3.26	1 1.34	0.260	1 0.47	0.490	1 1.24	29.8	1 -0.80	
125			12.35	4 -1.24													
127	12.27	1 0.53	12.56	3 -0.15	3.36	1 1.01											
128	12.08	1 -0.38	12.85	3 1.34	3.29	2 0.53			3.22	1 0.74	0.296	1 1.78	0.456	1 -2.28			
129	12.14	1 -0.09	12.57	3 -0.10			4.66	4 0.60	3.14	1 -0.44	0.235	2 -0.43	0.483	1 0.51	32.4	1 1.09	
130	12.26	1 0.48	12.53	4 -0.31	3.24	1 0.20	4.31	3 -0.40	3.11	1 -0.89	0.242	2 -0.18	0.482	1 0.41	32.0	1 0.80	
131	12.32	1 0.77	12.26	3 -1.71	3.39	2 1.21			3.18	1 0.14	0.249	2 0.07	0.894	1 43.16			
132	12.38	1 1.06	12.61	3 0.10					3.21	1 0.59	0.248	2 0.03	0.466	1 -1.24			
133	11.90	1 -1.26	12.69	3 0.51	3.03	2 -1.21	3.94	4 -1.46	3.16	1 -0.14	0.243	2 -0.14	0.481	1 0.31			
134	12.20	1 0.19	12.57	3 -0.10	3.24	1 0.20	4.63	4 0.51	3.08	1 -1.34	0.238	2 -0.32	0.480	1 0.20			
136	12.42	1 1.26	12.66	3 0.36	3.06	2 -1.01			3.26	1 1.34	0.219	2 -1.02	0.462	1 -1.66			
151	12.25	1 0.43	12.62	4 0.15	3.47	1 1.75			3.06	1 -1.64							
152	12.05	1 -0.53	12.25	5 -1.76	3.08	3 -0.87											
153	11.72	2 -2.13	12.46	4 -0.67	3.23	1 0.13	4.50	1 0.14	3.16	1 -0.14			0.607	1 13.38			
154	12.18	1 0.09	12.55	4 -0.20	3.35	1 0.94	4.08	2 -1.06	3.74	1 8.54	0.516	1 9.80	0.413	1 -6.74			
155	11.91	1 -1.21	12.98	3 2.02					3.35	1 2.69	0.231	3 -0.58	0.505	2 2.80			
156	12.30	1 0.68	12.54	3 -0.25	3.03	2 -1.21	5.02	3 1.63	3.20	1 0.44	0.239	2 -0.29	0.463	1 -1.55	25.4	3 -0.95	
157	12.21	1 0.24	12.44	3 -0.77	3.01	2 -1.34			3.09	1 -1.19			0.500	2 2.28			
158	12.20	1 0.19	12.77	3 0.93					3.18	1 0.14	0.245	2 -0.07	0.485	1 0.72	30.9	1 0.00	
159	12.19	1 0.14			3.64	1 2.90			3.46	1 4.34							
160	12.16	1 0.00	12.54	4 -0.25	3.14	2 -0.47	4.06	3 -1.11	3.23	1 0.89	0.289	1 1.53	0.490	1 1.24			
161	12.23	1 0.34	13.10	1 2.64	3.23	1 0.13	3.89	1 -1.60	3.15	1 -0.29							
162	12.68	1 2.52	12.26	1 -1.71	3.10	1 -0.74			3.42	1 3.74			0.504	2 2.69			
164	11.89	1 -1.31	12.43	3 -0.83			4.22	2 -0.66	3.22	1 0.74					27.3	3 0.25	
165	12.34	1 0.87	12.60	4 0.05	3.19	1 -0.13	4.05	2 -1.14	3.27	1 1.49	0.245	2 -0.07	0.475	1 -0.31	25.8	3 -0.69	
166	12.25	1 0.43	12.35	3 -1.24	3.23	1 0.13	4.40	2 -0.14	3.24	1 1.04							
167	12.32	1 0.77	12.55	3 -0.20	2.94	1 -1.82	4.57	2 0.34	3.30	1 1.94	0.262	2 0.54	0.472	1 -0.62			
168	12.29	1 0.63	12.53	3 -0.31	3.21	2 0.00			3.23	1 0.89	0.262	2 0.54	0.497	1 1.97			
169	11.98	1 -0.87	12.22	2 -1.91	3.38	1 1.14	4.54	2 0.25	3.20	1 0.44							
170	12.18	1 0.09	12.49	4 -0.51	3.18	1 -0.20	3.68	2 -2.21	3.19	1 0.29			0.491	1 1.34			
171	12.41	1 1.21	12.65	3 0.31	2.95	2 -1.75	4.64	2 0.54	3.31	1 2.09	0.275	1 1.02	0.461	1 -1.76			
172	12.16	1 0.00	12.49	3 -0.51					3.18	1 0.14					31.1	2 0.14	
173	11.87	1 -1.40	12.57	3 -0.10			4.06	2 -1.11	3.15	1 -0.29							
174	12.36	1 0.97	12.39	2 -1.03					3.26	2 1.34							
175	11.60	1 -2.72	12.80	2 1.08	3.31	1 0.67	4.59	2 0.40	3.20	1 0.44	0.221	2 -0.94	0.471	1 -0.72			
176	11.89	1 -1.31	12.02	2 -2.95	3.19	1 -0.13	4.22	2 -0.66	3.10	1 -1.04	0.273	2 0.94	0.495	1 1.76			
177	12.03	1 -0.63	12.88	4 1.50	3.47	1 1.75	4.47	1 0.05	3.15	1 -0.29			0.489	1 1.14			
178																	
179	11.93	1 -1.11	12.41	4 -0.93	3.30	2 0.60	4.61	2 0.45	3.20	1 0.44	0.272	2 0.91	0.422	1 -5.81			
180	12.32	1 0.77	12.91	4 1.66	3.36	1 1.01	5.35	2 2.58	3.14	1 -0.44			0.481	1 0.31			
181	12.11	1 -0.24	12.29	2 -1.55	3.33	1 0.80	4.03	2 -1.20	3.17	1 0.00	0.234	2 -0.47	0.467	1 -1.14	29.7	4 1.77	
181																	
191	12.18	1 0.09	12.43	4 -0.83	3.41	1 1.34	4.42	2 -0.08	3.14	1 -0.44							



表 5 A, B 及び D 試料

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		MN(管理分析法)		MN(飼料分析基準)		
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	
192																			
193	12.08	1 -0.38	12.75	3 0.83	3.08	2 -0.87			3.17	1 0.00									
194	12.15	1 -0.04	12.68	1 0.46	3.20	1 -0.06	4.33	2 -0.34	3.16	1 -0.14	0.256	1 0.32	0.470	1 -0.83					
195	11.73	1 -2.09	12.49	4 -0.51	3.04	1 -1.14	3.78	2 -1.92	3.16	1 -0.14	0.251	1 0.14	0.473	1 -0.51	31.6	2 0.51			
196	12.18	2 0.09	12.58	4 -0.05	3.19	1 -0.13	4.20	2 -0.71	3.14	1 -0.44	0.229	2 -0.65	0.449	1 <u>-3.00</u>			26.5	3 -0.25	
197	12.29	1 0.63	12.41	4 -0.93	3.24	1 0.20			3.15	1 -0.29									
198	12.33	1 0.82	12.72	2 0.67	3.26	1 0.33	4.07	2 -1.09	3.11	1 -0.89	0.302	1 2.00	0.465	1 -1.34					
199	12.23	1 0.34	12.55	3 -0.20	3.26	1 0.33	4.24	2 -0.60	3.16	1 -0.14	0.251	1 0.14	0.482	1 0.41					
200	12.12	1 -0.19	12.69	2 0.51	3.33	1 0.80	4.21	2 -0.68	3.17	1 0.00	0.254	2 0.25	0.524	1 <u>4.77</u>					
201	12.27	1 0.53	12.55	4 -0.20	3.07	2 -0.94	4.38	1 -0.20	3.19	1 0.29	0.232	2 -0.54	0.496	1 1.86					
202			12.80	3 1.08	3.21	2 0.00	4.86	3 1.17											
203	12.40	1 1.16	12.48	2 -0.57	3.25	1 0.26	4.00	2 -1.29	3.27	1 1.49	0.233	2 -0.51	0.480	1 0.20			26.5	3 -0.25	
204	11.96	1 -0.97	12.68	3 0.46	3.20	2 -0.06			3.20	1 0.44									
205	12.31	1 0.72	12.88	2 1.50	3.33	1 0.80			3.28	1 1.64									
206	11.96	1 -0.97	12.40	4 -0.98	3.48	1 1.82	4.54	3 0.25	3.07	1 -1.49	0.234	2 -0.47	0.474	1 -0.41					
207	12.03	1 -0.63							3.14	1 -0.44									
208	12.00	1 -0.77	12.57	4 -0.10	3.35	1 0.94	4.68	1 0.66	3.25	1 1.19	0.274	1 0.98	0.501	1 2.38					
209	11.93	1 -1.11	12.42	3 -0.88	3.14	2 -0.47	4.98	2 1.52	3.18	1 0.14					30.0	2 -0.65			
210	12.29	1 0.63	12.51	2 -0.41	3.20	1 -0.06	4.24	2 -0.60	3.11	1 -0.89			0.481	1 0.31					
211	11.83	1 -1.60	12.29	2 -1.55	3.19	1 -0.13	4.50	2 0.14	3.23	1 0.89	0.267	2 0.72	0.474	1 -0.41	31.4	1 0.34	28.7	4 1.14	
212	12.15	1 -0.04	12.62	3 0.15	3.02	1 -1.28	3.83	2 -1.77	3.25	1 1.19	0.216	2 -1.13	0.482	1 0.41					
213	12.44	1 1.36	12.20	4 -2.02	3.47	1 1.75	4.31	2 -0.40	3.14	1 -0.44	0.241	2 -0.21	0.471	1 -0.72					
214	12.40	1 1.16	12.60	4 0.05	3.40	1 1.28	4.05	2 -1.14	3.17	1 0.00	0.265	2 0.65	0.477	1 -0.10					
215	10.34	1 <u>-8.84</u>	12.17	3 -2.17	5.42	2 <u>14.90</u>			4.72	1 <u>23.23</u>									
216	12.26	1 0.48	12.68	3 0.46	3.36	1 1.01	3.90	2 -1.57	3.20	1 0.44	0.252	2 0.18	0.477	1 -0.10	31.2	1 0.21			
217	12.06	1 -0.48	12.62	4 0.15	2.84	2 -2.49	4.78	4 0.94	3.45	1 <u>4.19</u>	0.338	1 <u>3.31</u>	0.458	1 -2.07			28.7	3 1.14	
218	12.38	1 1.06	13.19	3 <u>3.11</u>	3.66	1 <u>3.03</u>	4.51	1 0.17	3.22	1 0.74	0.218	1 -1.05	0.473	1 -0.51					
219	12.05	1 -0.53	12.57	3 -0.10	3.17	2 -0.26	3.66	2 -2.26	3.25	1 1.19	0.231	2 -0.58	0.466	1 -1.24			26.2	3 -0.41	
220	12.14	1 -0.09	12.59	3 0.00	3.17	1 -0.26	4.61	2 0.45	3.09	1 -1.19	0.231	2 -0.58	0.476	1 -0.20					
221	12.14	1 -0.09					3.89	2 -1.60	3.17	1 0.00					32.1	1 0.84			
222	9.25	1 <u>-14.14</u>	12.64	4 0.25	3.00	2 -1.41													
223	11.76	1 -1.94	12.78	4 0.98	2.32	2 <u>-6.00</u>	4.29	3 -0.45	3.03	1 -2.09	0.332	2 <u>3.09</u>	0.448	1 <u>-3.11</u>					
224	13.10	1 <u>4.56</u>	14.18	4 <u>8.24</u>	3.81	1 <u>4.04</u>	5.38	3 2.66	3.56	1 <u>5.84</u>	0.355	2 <u>3.93</u>	0.644	1 <u>17.22</u>					
225	11.87	1 -1.40	12.95	2 1.86	3.29	1 0.53													
226	11.92	1 -1.16	12.45	2 -0.72	3.37	1 1.07	4.91	1 1.32	3.15	1 -0.29	0.221	2 -0.94	0.472	1 -0.62					
227	12.22	1 0.29	12.48	3 -0.57	3.40	1 1.28	3.51	2 -2.69	3.35	1 2.69	0.215	2 -1.16	0.480	1 0.20			25.4	3 -0.95	
228	11.74	1 -2.04	12.45	2 -0.72	3.39	1 1.21			3.19	1 0.29									
229	12.15	1 -0.04	12.60	3 0.05	3.18	1 -0.20			3.23	1 0.89	0.268	2 0.76	0.472	1 -0.62	30.3	2 -0.43			
230	12.02	1 -0.68	12.57	3 -0.10	3.19	2 -0.13			3.19	1 0.29									
231	12.31	1 0.72	12.63	4 0.20	3.16	1 -0.33			3.08	1 -1.34									
232	11.83	1 -1.60	12.66	3 0.36	3.21	2 0.00			3.25	1 1.19	0.238	2 -0.32	0.479	1 0.10					
251	12.65	1 2.38	12.81	3 1.14	3.31	2 0.67	4.99	3 1.54	3.12	1 -0.74	0.252	2 0.18	0.496	1 1.86					
252	12.27	1 0.53	12.62	2 0.15	3.38	1 1.14			3.11	1 -0.89									
253	12.25	1 0.43	12.49	2 -0.51	3.14	2 -0.47			3.28	1 1.64	0.201	2 -1.67	0.454	1 -2.49					
254	12.11	1 -0.24	12.26	4 -1.71	3.08	1 -0.87	5.38	1 2.66	3.11	1 -0.89	0.224	2 -0.83	0.484	1 0.62					
255	12.12	1 -0.19	12.74	4 0.77	3.52	1 2.09			3.15	1 -0.29	0.228	2 -0.69	0.495	1 1.76					
256	11.95	1 -1.02	12.90	3 1.60	3.33	2 0.80	4.17	1 -0.80	3.12	1 -0.74	0.257	2 0.36	0.466	1 -1.24					
257	11.94	1 -1.06	12.43	3 -0.83	3.20	1 -0.06	4.92	2 1.34	3.17	1 0.00	0.244	2 -0.10	0.500	1 2.28					
258	11.26	1 <u>-4.37</u>	12.90	3 1.60	3.15	1 -0.40			3.30	1 1.94	0.208	2 -1.42	0.465	1 -1.34					
259	11.21	1 <u>-4.61</u>							3.25	1 1.19							27.3	3 0.25	
260	11.18	1 <u>-4.76</u>							3.12	1 -0.74	0.316	2 2.51	0.478	1 0.00					
261	12.10	1 -0.29	12.66	4 0.36	3.27	1 0.40	4.68	3 0.66	3.16	1 -0.14	0.250	2 0.10	0.485	1 0.72					
262	11.92	1 -1.16	12.69	4 0.51	3.44	1 1.55	3.30	2 <u>-3.30</u>	3.34	1 2.54			0.470	1 -0.83					
263	11.31	1 <u>-4.13</u>	12.70	3 0.57	2.90	1 -2.09	4.29	1 -0.45	3.09	1 -1.19	0.220	2 -0.98	0.456	1 -2.28					
264	12.04	1 -0.58	12.38	3 -1.08	2.98	1 -1.55			2.96	1 <u>-3.14</u>									
265	12.24	1 0.38	12.70	3 0.57	3.34	1 0.87	4.26	2 -0.54	3.14	1 -0.44	0.229	2 -0.65	0.460	1 -1.86					
266	12.00	1 -0.77	12.68	3 0.46	3.25	2 0.26	3.61	2 -2.41	3.13	1 -0.59	0.240	2 -0.25	0.460	1 -1.86					
267	11.11	1 <u>-5.10</u>	12.49	3 -0.51	3.30	2 0.60			2.21	1 <u>-14.38</u>									
268	12.14	1 -0.09	12.62	3 0.15	3.03	2 -1.21	4.30	2 -0.43	3.17	1 0.00	0.250	1 0.10	0.474	1 -0.41	32.0	1 0.80			
269	11.67	1 -2.38	12.41	4 -0.93	3.11	2 -0.67	6.25	2 <u>5.16</u>	3.17	1 0.00	0.261	2 0.51	0.482	1 0.41					
270	12.20	1 0.19	12.63	3 0.20					3.19	1 0.29									
271	11.36	1 <u>-3.88</u>	12.74	2 0.77	3.70	1 <u>3.30</u>	4.46	2 0.02	3.24	1 1.04	0.325	2 2.84	0.412	1 <u>-6.84</u>					
272	12.41	1 1.21	12.50	3 -0.46	3.24	2 0.20	4.69	1 0.68	3.19	1 0.29	0.292	2 1.64	0.481	1 0.31	29.7	2 -0.87			
273																	25.7	3 -0.76	
274	12.27	1 0.53	12.37	4 -1.14	3.18	1 -0.20	4.49	2 0.11	3.10	1 -1.04									
275	12.40	1 1.16	12.51	3 -0.41	2.94	2 -1.82	4.31	2 -0.40	3.17	1 0.00	0.232	2 -0.54	0.483	1 0.51					
276	12.16	1 0.00	12.74	3 0.77	3.22	2 0.06	4.71	3 0.74	3.21	1 0.59	0.240	2 -0.25	0.497	1 1.97					
277	11.99	1 -0.82	12.53	3 -0.31	3.17	2 -0.26			3.13	1 -0.59									
278	11.08	1 <u>-5.25</u>	12.09	2 -2.59	3.51	1 2.02	5.37	2 2.64	3.09	1 -1.19									
279	12.18	1 0.09	12.65	3 0.31	3.12	2 -0.60	4.36	2 -0.25	3.08	1 -1.34	0.271	2 0.87	0.481	1 0.31	32.2	1 0.94			
280	12.00	1 -0.77	13.17	3 <u>3.00</u>					3.18	1 0.14	0.229	2 -0.65	0.494	1 1.66					
281	12.41	1 1.21	12.53	3 -0.31	3.20	1 -0.06	4.52	2 0.20	3.15	1 -0.29	0.220	2 -0.98	0.473	1 -0.51			30.7	4 2.40	



表5 A, B 及び D 試料

試料 番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン		MN(管理分析法)		MN(飼料分析基準)	
	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score												
284	12.33	1 0.82	13.09	2 2.59	3.55	1 2.29	4.64	2 0.54	3.13	1 -0.59	0.268	1 0.76	0.471	1 -0.72				
285	11.94	1 -1.06	12.31	4 -1.45	3.16	1 -0.33	4.60	1 0.43	3.15	1 -0.29			0.466	1 -1.24				
286	12.00	1 -0.77	12.68	3 0.46					3.18	1 0.14	0.223	2 -0.87	0.480	1 0.20				
287	12.40	1 1.16	12.60	4 0.05	3.17	2 -0.26			3.15	1 -0.29								
288	11.72	1 -2.13	12.78	3 0.98	3.09	1 -0.80	4.10	2 -1.00	3.16	1 -0.14	0.270	2 0.83	0.470	1 -0.83	29.4	1 -1.09		
289	11.96	1 -0.97	12.58	4 -0.05	3.51	1 2.02	3.93	2 -1.49	3.17	1 0.00	0.272	2 0.91	0.478	1 0.00				
290	12.18	1 0.09	13.00	3 2.12	3.20	2 -0.06	4.70	3 0.71	3.23	1 0.89	0.219	2 -1.02	0.455	1 -2.38				
291	11.67	1 -2.38	12.74	3 0.77	3.05	2 -1.07	4.58	4 0.37	3.18	1 0.14	0.279	1 1.16	0.483	1 0.51				
292	12.56	1 1.94													30.4	1 -0.36		
293			12.80	3 1.08	3.21	2 0.00	4.86	3 1.17										
294																		
295	12.13	1 -0.14	12.54	3 -0.25	3.26	1 0.33			3.10	1 -1.04	0.223	2 -0.87	0.478	1 0.00				
296	12.07	1 -0.43	12.72	3 0.67	3.17	2 -0.26	4.06	2 -1.11	3.21	1 0.59	0.224	2 -0.83	0.476	1 -0.20				
297	12.13	1 -0.14	12.73	3 0.72					3.31	1 2.09					32.3	2 1.02		
298	11.97	1 -0.92	12.72	3 0.67	3.09	2 -0.80	4.67	3 0.63	3.11	1 -0.89	0.254	2 0.25	0.475	1 -0.31				
299	12.45	1 1.40	12.43	3 -0.83	3.32	1 0.74	4.47	2 0.05	3.06	1 -1.64	0.292	1 1.64	0.487	1 0.93			30.6	3 2.34
300	12.38	1 1.06	12.02	2 -2.95	3.57	1 2.42	4.38	2 -0.20	3.10	1 -1.04	0.268	2 0.76	0.472	1 -0.62				

注1: z-scoreの欄に下線を付したものは、絶対値が3以上のものである。  
 注2: 各試料のNo.欄は、分析法を示す。対応は以下のとおりである。

水分	粗たん白質	粗脂肪	粗繊維	粗灰分	カルシウム	リン	モネンシンナトリウム (MN)
No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法	No. 分析方法
1 飼料分析基準	1 硫酸標準液吸 収法	1 飼料分析基準	1 静置法	1 飼料分析基準	1 シュウ酸アンモ ニウム法	1 飼料分析基準	1 迅速定量法
2 その他	2 ホウ酸溶液吸 収法	2 自動分析機	2 ろ過法	2 その他	2 原子吸光度 法	2 その他	2 フローインジェク ション法
	3 燃焼法	3 その他	3 自動分析機		3 その他		3 液体クロマトグラフ法
	4 自動分析機		4 その他				4 微生物学的定量法
	5 その他						

の分析成績 (4)

B試料				D試料										試料 番号		
水分		粗たん白質		粗灰分		カドミウム		エトキシキン		銅		亜鉛			クエン酸モランテル	
分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (%)	No. z-score	分析値 (g/トン)	No. z-score	分析値 (g/トン)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	
8.39	1 -0.22	65.80	2 -0.45	15.96	1 -0.33											284
8.32	1 -0.73	65.08	4 -1.56	15.92	1 -0.71											285
8.39	1 -0.22	66.71	3 0.93	15.97	1 -0.23											286
8.51	1 0.66	65.53	4 -0.87	15.98	1 -0.14			181.9	1 0.54							287
8.22	1 -1.47	66.57	3 0.72	15.98	1 -0.14					34.40	1 4.54	30.83	1 1.29			288
8.37	1 -0.36	65.12	4 -1.50	15.94	1 -0.52					31.21	1 -0.13	31.85	1 2.33			289
8.37	1 -0.36	65.99	3 -0.16	16.11	1 1.08											290
8.30	1 -0.88	66.56	3 0.70	15.92	1 -0.71					32.29	1 1.45	29.82	1 0.27			291
8.53	1 0.81							175.4	1 -0.17	31.55	1 0.36	29.01	1 -0.54	7.6	1 0.33	292
		66.50	3 0.61													293
								177.6	1 0.07							294
8.50	1 0.59	66.09	3 -0.01	15.90	1 -0.89					31.92	1 0.90					295
8.33	1 -0.66	66.84	3 1.13	16.03	1 0.33			183.7	1 0.74	32.11	1 1.18	30.72	1 1.18	7.5	1 0.00	296
8.37	1 -0.36	64.74	3 -2.08	16.09	1 0.89											297
8.28	1 -1.03	66.51	3 0.62	15.95	1 -0.42	1.71	2 -0.30									298
8.73	1 2.29	65.79	3 -0.47	15.76	1 -2.22			157.5	1 -2.14					7.0	1 -1.68	299
8.57	1 1.10	63.45	2 -4.06	15.80	1 -1.84											300

カドミウム      エトキシキン      銅      亜鉛      クエン酸モランテル  
 No. 分析方法      No. 分析方法      No. 分析方法      No. 分析方法      No. 分析方法  
 1 溶媒抽出法      1 飼料分析基準      1 飼料分析基準      1 飼料分析基準      1 飼料分析基準  
 2 簡易法      2 その他      2 その他      2 その他      2 その他  
 3 その他

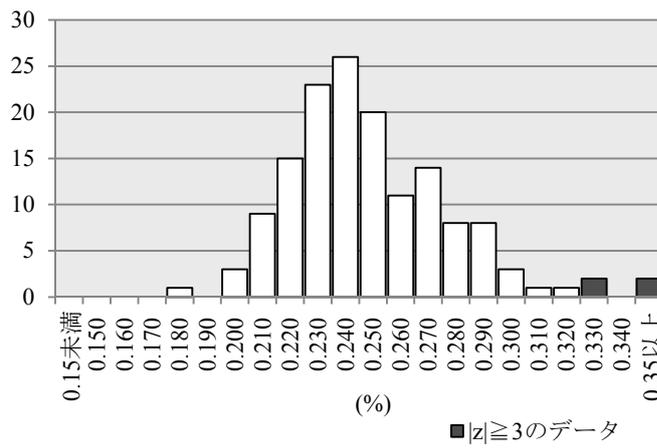
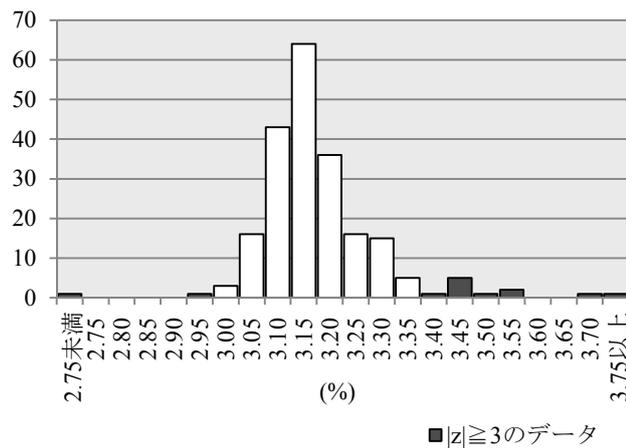
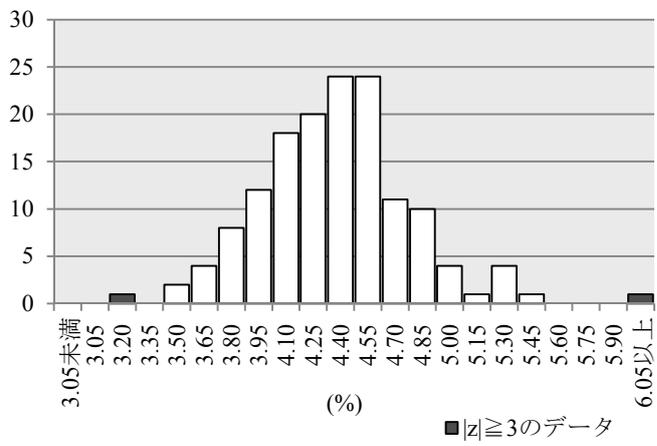
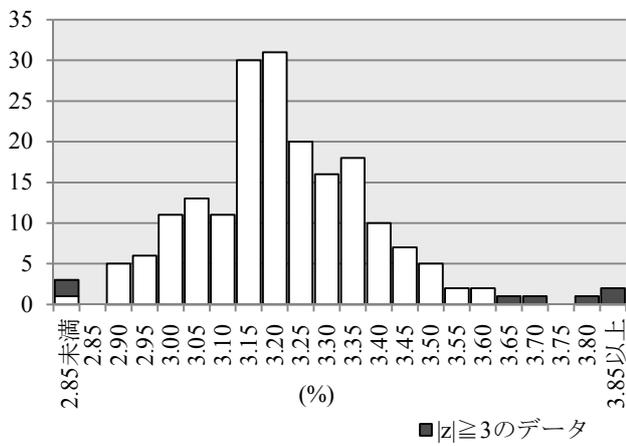
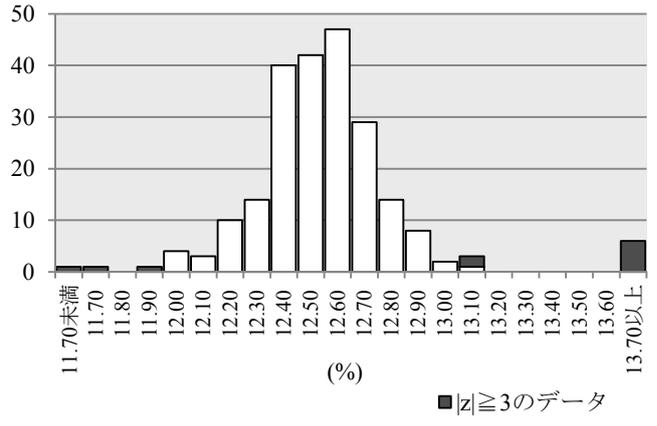
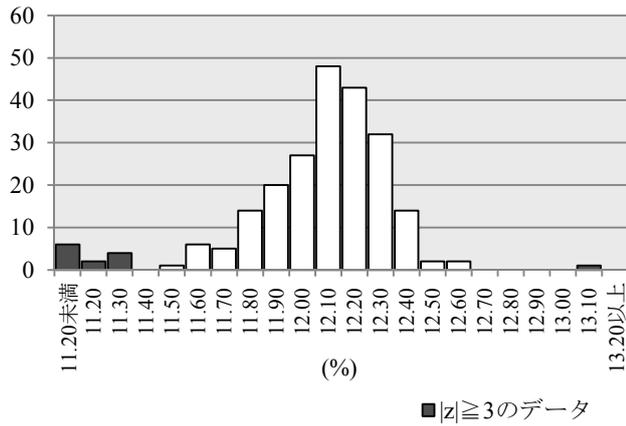


図1 分析成績のヒストグラム (1)

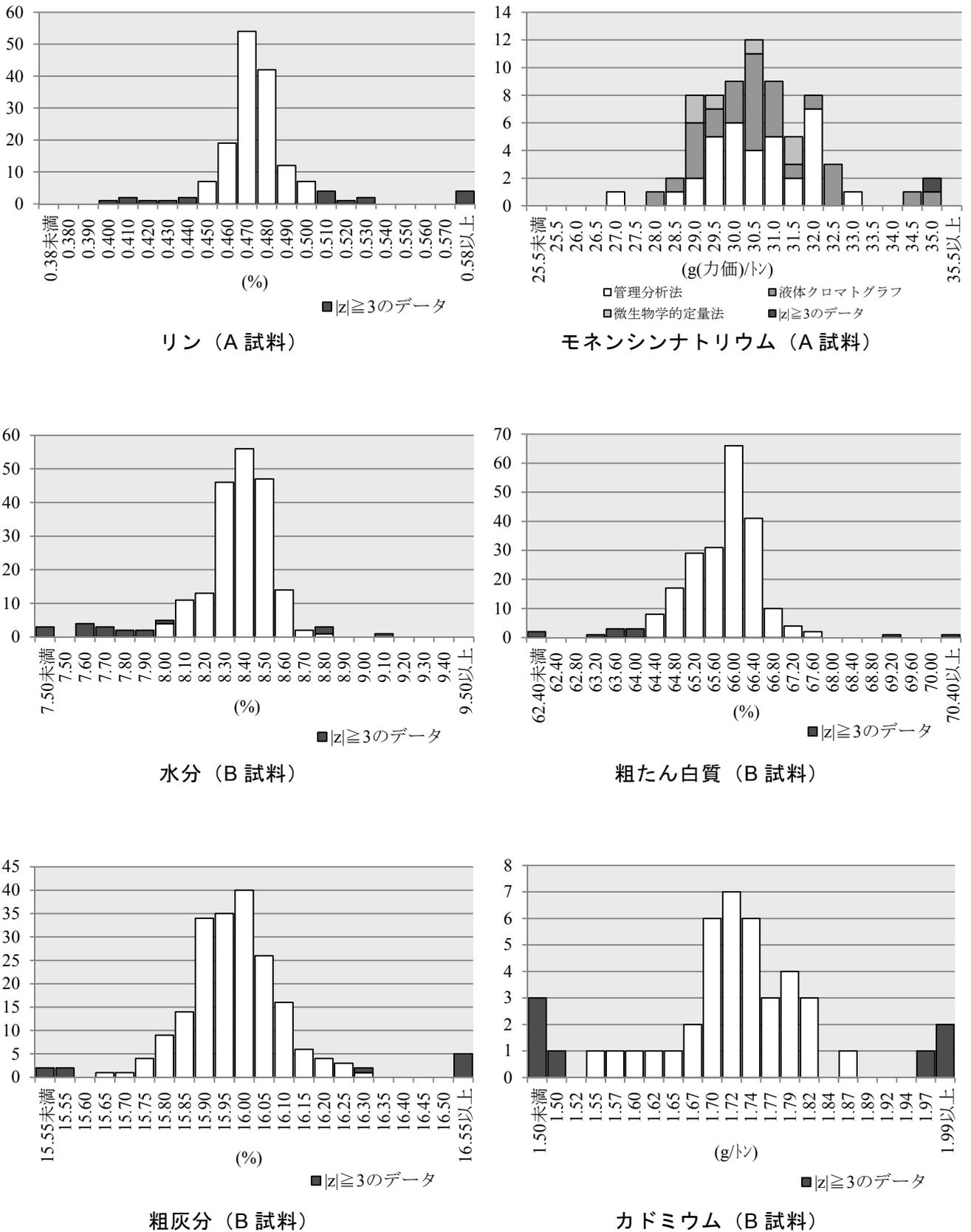
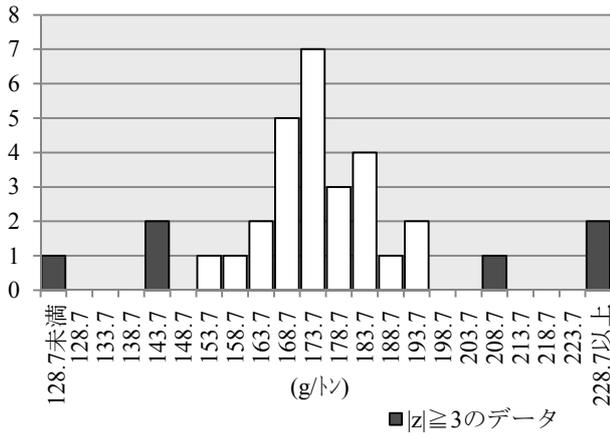
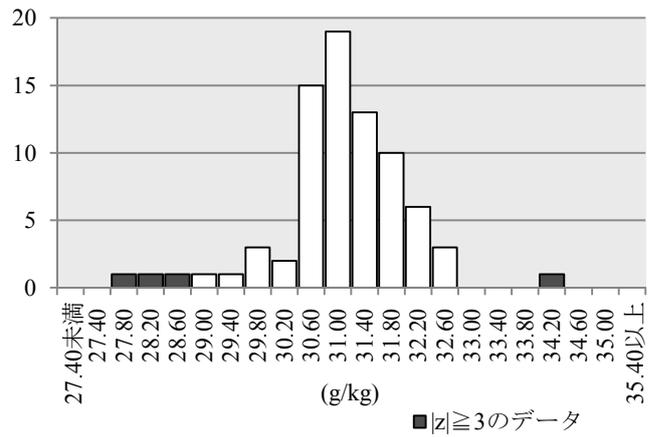


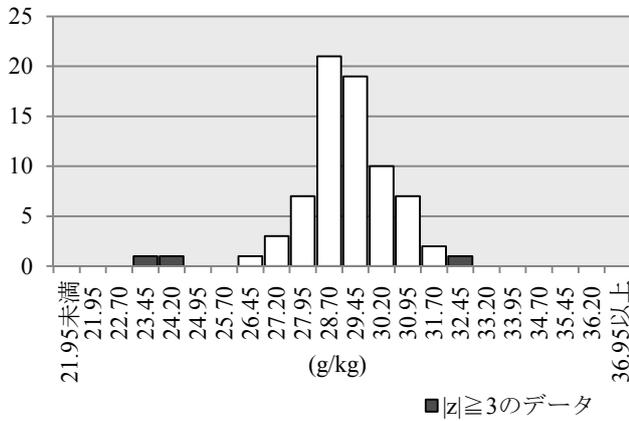
図 1 分析成績のヒストグラム (2)



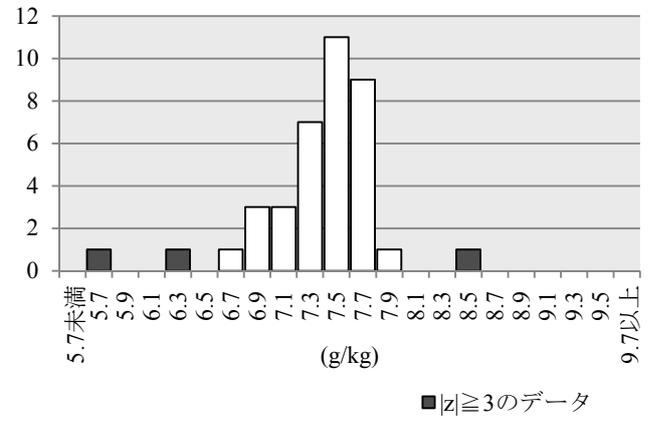
エトキシキン (B 試料)



銅 (D 試料)



亜鉛 (D 試料)



クエン酸モランテル (D 試料)

図 1 分析成績のヒストグラム (3)

表 6 A 試料の解析結果

区 分 <sup>注1</sup>	水分 (%)	粗たん白質 (%)	粗脂肪 (%)	粗繊維 (%)	粗灰分 (%)
データ数	218	225	195	145	211
1 中央値	12.16	12.59	3.21	4.45	3.17
1 下限境界値 <sup>注2</sup>	11.54	12.01	2.77	3.40	2.97
1 上限境界値 <sup>注2</sup>	12.78	13.17	3.65	5.50	3.37
2 平均値	12.14	12.57	3.23	4.45	3.18
2 標準偏差	0.20	0.19	0.15	0.38	0.07
2 変動係数 (%)	1.6	1.5	4.7	8.5	2.3
2 95%信頼区間	12.12~12.17	12.55~12.60	3.21~3.25	4.39~4.51	3.17~3.19

区 分	カルシウム (%)	リン (%)	MN(管理分析法) <sup>注3</sup> (g(力価)/トン)	MN(飼料分析基準) <sup>注4</sup> (g(力価)/トン)
データ数	147	159	35	35
1 中央値	0.247	0.478	30.9	26.9
1 下限境界値 <sup>注2</sup>	0.165	0.449	26.8	22.2
1 上限境界値 <sup>注2</sup>	0.329	0.507	35.0	31.6
2 平均値	0.251	0.478	30.8	27.3
2 標準偏差	0.026	0.011	1.2	1.8
2 変動係数 (%)	10.2	2.3	4.0	6.4
2 95%信頼区間	0.246~0.255	0.476~0.480	30.3~31.2	26.7~27.9

注 1 区分 1 の数値は報告された分析値から算出した結果であり、区分 2 は区分 1 で算出した z-スコアの絶対値が 3 以上の異常値を除外して算出した結果である。

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

3 MN (管理分析法) は、モネンシンナトリウムの迅速定量法及びフローインジェクション法を集計した結果である。

4 MN (飼料分析基準) は、モネンシンナトリウムの液体クロマトグラフ法及び微生物学的定量法を集計した結果である。

表 7 B 試料の解析結果

区 分 <sup>注1</sup>	水分 (%)	粗たん白質 (%)	粗灰分 (%)	カドミウム (g/トン)	エトキシキン (g/トン)
データ数	212	219	204	44	32
1 中央値	8.42	66.10	16.00	1.73	177.0
1 下限境界値 <sup>注2</sup>	8.01	64.14	15.68	1.54	149.8
1 上限境界値 <sup>注2</sup>	8.83	68.06	16.31	1.92	204.1
2 平均値	8.43	66.00	15.99	1.73	177.6
2 標準偏差	0.14	0.65	0.11	0.07	9.7
2 変動係数 (%)	1.6	1.0	0.7	4.0	5.5
2 95%信頼区間	8.41~8.45	65.92~66.09	15.98~16.01	1.71~1.75	173.9~181.4

注 1 区分 1 の数値は報告された分析値から算出した結果であり、区分 2 は区分 1 で算出した z-スコアの絶対値が 3 以上の異常値を除外して算出した結果である。

2 z-スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 8 D 試料の解析結果

区 分 <sup>注1</sup>	銅 (g/kg)	亜鉛 (g/kg)	クエン酸モランテル (g/kg)
データ数	77	73	38
1 中央値	31.30	29.55	7.5
1 下限境界値 <sup>注2</sup>	29.25	26.59	6.6
1 上限境界値 <sup>注2</sup>	33.35	32.51	8.4
2 平均値	31.35	29.65	7.5
2 標準偏差	0.71	1.08	0.3
2 変動係数 (%)	2.3	3.7	3.7
95 %信頼区間	31.19~31.52	29.39~29.90	7.4~7.6

注 1 区分 1 の数値は報告された分析値から算出した結果であり、区分 2 は区分 1 で算出した  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上の異常値を除外して算出した結果である。

2  $z$ -スコアの絶対値が 3 の境界値である。

表 9 混合した原料の鑑定成績

原 料 名	混合割合 (%)	試 験 室 数				検出率 (%)	
		検 出			不検出		
		多量 <sup>注1</sup>	中量 <sup>注2</sup>	少量 <sup>注3</sup>			計
とうもろこし	35	123	0	0	123	0	100
マ イ ロ	17	51	68	3	122	1	99
小 麦	10	47	65	6	118	5	96
米ぬか油かす	10	0	42	30	72	51	59
ごま油かす	10	0	40	24	64	59	52
なたね油かす	7	5	98	15	118	5	96
魚 粉	3	1	3	97	101	22	82
アルファルファミール	3	0	50	70	120	3	98
炭酸カルシウム	3	0	0	79	79	44	64
食 塩	2	0	0	121	121	2	98

注 1 検出した原料の推定される混合割合が 15 %以上と報告されたもの。

2 検出した原料の推定される混合割合が 5 %以上 15 %未満と報告されたもの。

3 検出した原料の推定される混合割合が 1 %以上 5 %未満と報告されたもの。

表 10 混合した原料以外に検出と報告されたもの

検出原料名	多量 <sup>注1</sup>	中量 <sup>注2</sup>	少量 <sup>注3</sup>	計
玄米	2	5	2	9
大麦	3	1	0	4
キャッサバ	0	3	1	4
精白米	0	1	3	4
ライ麦	0	1	0	1
大豆油かす	2	49	8	59
あまに油かす	0	9	13	22
やし油かす	0	4	4	8
綿実油かす	0	1	1	2
カポック油かす	0	1	0	1
サフラワー油かす	0	0	1	1
ふすま	0	7	2	9
スクリーニングペレット	1	3	0	4
コーングルテンフィード	1	1	2	4
ホミニーフード	0	2	0	2
コーングルテンミール	0	1	0	1
麦ぬか	0	0	1	1
チキンミール	0	1	3	4
肉骨粉	0	0	2	2
フェザーミール	0	0	2	2
リン酸カルシウム	0	0	36	36
ビートパルプ	0	4	0	4
かき殻	0	0	1	1
ゼオライト	0	0	1	1

注 1 検出した原料の推定される混合割合が 15 %以上と報告されたもの。

2 検出した原料の推定される混合割合が 5 %以上 15 %未満と報告されたもの。

3 検出した原料の推定される混合割合が 1 %以上 5 %未満と報告されたもの。

## 8 各試料の解析結果及び鑑定成績

以下、分析法別の解析結果では、分析法別に分けたデータでロバスト法に基づく  $z$ -スコアを求め、その絶対値が 3 以上の分析値を異常値として棄却し、平均値、標準偏差及び相対標準偏差を求めた。

### 8.1 A 試料（肉用牛肥育用配合飼料）の解析結果

#### 1) 水 分

分析値は 218 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 13 件であった。これらを除いた平均値は 12.14 %で、この 95 %信頼区間は 12.12~12.17 %であった。分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、213 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 12 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 12.15 %、0.20 %及び 1.6 %であった。

その他の方法では、定温乾燥機以外の機器を用いた 5 件の報告があった。

## 2) 粗たん白質

分析値は 225 件の報告があり、ロバスト法による z-スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 件であった。これらを除いた平均値は 12.57 %で、この 95 %信頼区間は 12.55~12.60 %であった。分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法では、14 件（うち z-スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 12.38 %、0.34 %及び 2.7 %であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、30 件（うち z-スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 12.55 %、0.27 %及び 2.1 %であった。

飼料分析基準・燃焼法では、115 件（うち z-スコアの絶対値が 3 以上のものは 5 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 12.61 %、0.15 %及び 1.2 %であった。

自動分析機による方法では、65 件（うち z-スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 12.55 %、0.17 %及び 1.3 %であった。

## 3) 粗脂肪

分析値は 195 件の報告があり、ロバスト法による z-スコアの絶対値が 3 以上のものは 7 件であった。これらを除いた平均値は 3.23 %で、この 95 %信頼区間は 3.21~3.25 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、123 件（うち z-スコアの絶対値が 3 以上のものは 4 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.28 %、0.15 %及び 4.5 %であった。

自動分析機による方法では、71 件（うち z-スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.15 %、0.12 %及び 3.8 %であった。

## 4) 粗繊維

分析値は 145 件の報告があり、ロバスト法による z-スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件であった。これらを除いた平均値は 4.45 %で、この 95 %信頼区間は 4.39~4.51 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・静置法では、18 件の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 4.47 %、0.30 %及び 6.7 %であった。

飼料分析基準・ろ過法では、84 件（うち z-スコアの絶対値が 3 以上のものは 5 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 4.28 %、0.30 %及び 7.1 %であった。

自動分析機による方法では、38 件（うち z-スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 4.67 %、0.31 %及び 6.6 %であった。

その他の方法では、自動分析ではない粗繊維測定用機器を用いた方法等の 5 件の報告があった。

## 5) 粗灰分

分析値は 211 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 13 件であった。これらを除いた平均値は 3.18 %で、この 95 %信頼区間は 3.17~3.19 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、208 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 13 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 3.18 %、0.07 %及び 2.3 %であった。

その他の方法では、自動分析装置による測定等の 3 件の報告があった。

## 6) カルシウム

分析値は 147 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 4 件であった。これらを除いた平均値は 0.251 %で、この 95 %信頼区間は 0.246~0.255 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・シュウ酸アンモニウム法では、23 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.273 %、0.029 %及び 10.8 %であった。

飼料分析基準・原子吸光光度法では、119 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.246 %、0.023 %及び 9.4 %であった。

その他の方法では、ICP による測定、キレート滴定法等の 5 件の報告があった。

## 7) リン

分析値は 159 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 18 件であった。これらを除いた平均値は 0.478 %で、この 95 %信頼区間は 0.476~0.480 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、155 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 18 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.477 %、0.010 %及び 2.1 %であった。

その他の方法では、ICP による測定、モリブデン青吸光光度法等の 4 件の報告があった。

## 8) モネンシンナトリウム

管理分析法では、分析値はモネンシンナトリウム無添加試料（未配布）のブランク値による補正が必要であるが、今回は補正されない分析値の報告であるため、飼料分析基準による分析値との間に差が生じる可能性があったことから、これらを分離して集計した。

管理分析法（迅速定量法及びフローインジェクション法）では、分析値は 35 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件であった。これを除いた平均値は 30.8 g(力価)/トンで、この 95 %信頼区間が 30.3~31.2 g(力価)/トンであった。

飼料分析基準（液体クロマトグラフ法及び微生物学的定量法）では、分析値は 35 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものはなかった。その平均値は 27.3 g(力価)/トンで、この 95 %信頼区間は 26.7~27.9 g(力価)/トンであった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

管理分析法・迅速定量法では、21 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 30.8 g(力価)/トン、1.3 g(力価)/トン及び 4.3 %であった。

管理分析法・フローインジェクション法では、14 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 30.7 g(力価)/トン、1.1 g(力価)/トン及び 3.6 %であった。

飼料分析基準・液体クロマトグラフ法では、29 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 26.6 g(力価)/トン、1.2 g(力価)/トン及び 4.3 %であった。

飼料分析基準・微生物学的定量法では、6 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 29.4 g(力価)/トン、1.1 g(力価)/トン及び 3.8 %であった。

## 8.2 B 試料（魚粉）の解析結果

### 1) 水分

分析値は 212 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 18 件であった。これらを除いた平均値は 8.43 %で、この 95 %信頼区間は 8.41~8.45 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、207 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 16 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 8.42 %、0.14 %及び 1.7 %であった。

その他の方法では、定温乾燥機以外の機器を用いた場合等の 5 件の報告があった。

### 2) 粗たん白質

分析値は 219 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 9 件であった。これらを除いた平均値は 66.00 %で、この 95 %信頼区間は 65.92~66.09 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・硫酸標準液吸収法では、12 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 65.31 %、0.66 %及び 1.0 %であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、28 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 65.66 %、0.69 %及び 1.0 %であった。

飼料分析基準・燃焼法では、112 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 9 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 66.35 %、0.31 %及び 0.5 %であった。

自動分析機による方法では、66 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 65.48 %、0.61 %及び 0.9 %であった。

### 3) 粗灰分

分析値は 204 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件であった。これらを除いた平均値は 15.99 %で、この 95 %信頼区間は 15.98~16.01 %であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、201 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 10 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 15.99 %、0.10 %及び 0.6 %であった。

その他の方法では、自動分析装置による測定等の 3 件の報告があった。

## 4) カドミウム

分析値は 44 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 7 件であった。これらを除いた平均値は 1.73 g/トンで、この 95 %信頼区間は 1.71~1.75 g/トンであった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準・溶媒抽出法では、14 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 1.78 g/トン、0.04 g/トン及び 2.4 %であった。

飼料分析基準・簡易法では、28 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 1.72 g/トン、0.07 g/トン及び 4.0 %であった。

その他の方法では、ICP による測定等の 2 件の報告があった。

## 5) エトキシキン

分析値は 32 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 6 件であった。これらを除いた平均値は 177.6 g/トンで、この 95 %信頼区間は 173.9~181.4 g/トンであった。

分析値はすべて飼料分析基準による報告であり、その標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 9.7 g/トン及び 5.5 %であった。

## 8.3 D 試料（ほ乳期子豚育成用プレミックス）の解析結果

## 1) 銅

分析値は 77 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 4 件であった。これらを除いた平均値は 31.35 g/kg で、この 95 %信頼区間は 31.19~31.52 g/kg であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、74 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 4 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 31.38 g/kg, 0.70 g/kg 及び 2.2 %であった。

その他の方法では、ICP による測定等の 3 件の報告があった。

## 2) 亜鉛

分析値は 73 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件であった。これらを除いた平均値は 29.65 g/kg で、この 95 %信頼区間は 29.39~29.90 g/kg であった。

分析法別の解析結果は、以下のとおりであった。

飼料分析基準では、70 件（うち  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 2 件）の報告があり、その平均値、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 29.71 g/kg, 1.15 g/kg 及び 3.9 %であった。

その他の方法では、ICP による測定等の 3 件の報告があった。

## 3) クエン酸モランテル

分析値は 38 件の報告があり、ロバスト法による  $z$ -スコアの絶対値が 3 以上のものは 3 件であった。これらを除いた平均値は 7.5 g/kg で、この 95 %信頼区間は 7.4~7.6 g/kg であった。

分析値はすべて飼料分析基準による報告であり、標準偏差及び相対標準偏差はそれぞれ 0.3

g/kg 及び 3.7 %であった。

#### 8.4 C 試料（鑑定用試料）の鑑定成績

混合した 10 種類の原料の検出とその混合割合の推定を行った。原料混合割合の推定は、15 % 以上を多量、5 %以上 15 %未満を中量、1 %以上 5 %未満を少量として報告を求めた。

123 件の報告があり、混合した原料以外に検出と報告があった原料は 24 種類であった。

混合した原料について、とうもろこし（混合割合 35 %）は、123 件（検出率 100 %）の報告があり、原料混合割合の推定の内訳は多量が 123 件であった。

マイロ（混合割合 17 %）は、122 件（検出率 99 %）の報告があり、その内訳は多量が 51 件、中量が 68 件、少量が 3 件であった。

小麦（混合割合 10 %）は、118 件（検出率 96 %）の報告があり、その内訳は多量が 47 件、中量が 65 件、少量が 6 件であった。

米ぬか油かす（混合割合 10 %）は、72 件（検出率 59 %）の報告があり、その内訳は中量が 42 件、少量が 30 件であった。

ごま油かす（混合割合 10 %）は、64 件（検出率 52 %）の報告があり、その内訳は中量が 40 件、少量が 24 件であった。

なたね油かす（混合割合 7 %）は、118 件（検出率 96 %）の報告があり、その内訳は多量が 5 件、中量が 98 件、少量が 15 件であった。

魚粉（混合割合 3 %）は、101 件（検出率 82 %）の報告があり、その内訳は多量が 1 件、中量が 3 件、少量が 97 件であった。

アルファルファミール（混合割合 3 %）は、120 件（検出率 98 %）の報告があり、その内訳は中量が 50 件、少量が 70 件であった。

炭酸カルシウム（配合割合 3 %）は、79 件（検出率 64 %）の報告があり、その内訳は少量が 79 件であった。

食塩（混合割合 2 %）は、121 件（検出率 98 %）の報告があり、その内訳は少量が 121 件であった。

誤って検出された原料としては、大豆油かすが最も多く、59 件の報告があった。次いで、リン酸カルシウムが 36 件、あまに油かすが 22 件と続いた。

## 文 献

- 1) Michael Thompson, Stephen L. R. Ellison, Roger Wood: The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78**(1), 145-196 (2006).

(参考)

## 平成 28 年度飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領

### 1. 目的

飼料検査指導機関、飼料・飼料添加物製造等業者、民間分析機関等を対象に、飼料等の共通試料による分析鑑定を行うことにより、分析及び鑑定技術の維持向上を図り、併せて分析誤差を把握し、飼料等の適正な製造及び品質管理の実施に資する。

### 2. 共通試料の内容

- A 試料…肉用牛肥育用配合飼料
- B 試料…魚粉
- C 試料…鑑定用飼料原料混合試料
- D 試料…ほ乳期子豚育成用プレミックス

### 3. 分析鑑定項目

- A 試料・・・水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム、リン及びモネンシンナトリウム
- B 試料・・・水分、粗たん白質、粗灰分、カドミウム及びエトキシキン
- C 試料・・・飼料原料の検出及び混合割合の推定
- D 試料・・・銅、亜鉛及びクエン酸モランテル

### 4. 分析鑑定要領

- (1) 試料の分析鑑定方法は、「飼料分析基準」（平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号農林水産省消費・安全局長通知）に定める方法及び「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」（昭和 53 年 9 月 5 日付け 53 畜 B 第 2173 号、53 水振第 464 号農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知）の別記にあるサリノマイシンナトリウム又はモネンシンナトリウムを含む飼料の管理方法に準拠してください。

なお、参考までにこれらの分析法の抜粋（飼料分析基準等（抜粋））を添付します。

また、各分析法の末尾に、試料採取量等の一例を記載しましたので、参考として下さい。

- (2) 上記 3 に示した分析鑑定項目のうち、各試験室において実施可能な項目（全項目でなくても可）について分析及び鑑定を行い、報告してください。
- (3) B 試料のエトキシキンの分析に用いる標準品は、今回配付したものを使用してください。（当該標準品は冷蔵庫に保管してください。）
- (4) 共通試料は冷蔵庫に保管し、使用する際には、常温に戻してください。
- (5) 複数の分析法（例えば、粗たん白質におけるケルダール法及び燃焼法）によって分析した場合は、それぞれの分析値を報告してください。

### 5. 分析鑑定成績の報告

- (1) 各分析値及び鑑定結果については、別添の「平成 28 年度飼料等の共通試料による分析鑑定

結果報告書」に記入し、報告してください。

- (2) 分析値は、水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カルシウム及びリンについては%で、モネンシンナトリウムについてはg(力価)/トンで、銅、亜鉛及びクエン酸モランテルについてはg/kgで、カドミウム、エトキシキンについてはg/トンの単位で表記してください。

水分、粗たん白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、カドミウム、銅及び亜鉛の分析値は、小数点以下第3位を四捨五入して同第2位まで、カルシウム及びリンの分析値は小数点以下第4位を四捨五入して同第3位まで、モネンシンナトリウム、エトキシキン及びクエン酸モランテルの分析値は小数点以下第2位を四捨五入して同第1位まで記入してください。

分析法及び用いた分析機器等は、備考欄の該当番号に○印を付し、その詳細を報告書様式に従い、記入してください。

また、分析上の特記事項等があれば、その旨も記入してください。

水分について、定温乾燥機を用いて飼料分析基準の条件により測定した場合には、「1. 飼料分析基準」を選択してください。定温乾燥機以外の機器を用いた場合や、定温乾燥機を用いたが、加熱温度、時間が飼料分析基準の条件と異なる場合は、「2. その他の方法」を選択し、用いた機器のメーカー、測定条件等の詳細を記入してください。

粗たん白質について、古典的なガラス器具製の蒸留装置を用いて蒸留し、ビュレット等を用いて滴定した場合には「1. 飼料分析基準（ケルダール法（硫酸標準液吸収法）」または「2. 飼料分析基準（ケルダール法（ホウ酸溶液吸収法）」を選択してください。自動蒸留装置等で蒸留後、滴定した場合は「4. 自動分析機」を選択してください。

なお、クエン酸モランテル、エトキシキン及びモネンシンナトリウム（液体クロマトグラフ法）を分析した場合には、標準液及び試料溶液のクロマトグラム各1葉を添付してください。

- (3) 鑑定結果は、検出した原料名を報告書（4）の下欄の検出原料名の選択肢から選んで検出原料名欄に記入し、推定される混合割合は、多量（15%以上）、中量（5%以上15%未満）及び少量（1%以上5%未満）の欄に○印を付してください。1%未満と推定される検出物は、検出原料名欄には記入しないでください。なお、C試料には10種類の原料を混合しています。

検出方法は、該当する番号に○印を付してください。（複数回答可）

- (4) 分析の一部を別の試験室等で実施した場合は、その試験室名を備考欄に記入してください。  
(5) 平成28年9月23日（金）までに報告してください。  
(6) 報告書は、所属する飼料品質改善協議会等により下表に従った報告先に送付してください。

表削除

## 平成 28 年度飼料等の共通試料による分析鑑定結果報告書 (様式)

試験室名

担当者

TEL

## (1) A 試料 分析結果

試料番号

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
粗たん白質	(%)	1.飼料分析基準 (ケルダール法 (硫酸標準液吸収法)) 2.飼料分析基準 (ケルダール法 (ホウ酸溶液吸収法)) 3.飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4.自動分析機 (メーカー) (型式) 5.その他の方法 ( )
粗脂肪	(%)	1.飼料分析基準 2.自動分析機 (メーカー) (型式) 3.その他の方法 ( )
粗繊維	(%)	1.飼料分析基準 (静置法) 2.飼料分析基準 (ろ過法) 3.自動分析機 (メーカー) (型式) 4.その他の方法 ( )
粗灰分	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
カルシウム	(%)	1.飼料分析基準 (シュウ酸アンモニウム法) 2.飼料分析基準 (原子吸光光度法) 3.その他の方法 ( )
リン	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
モネンシン ナトリウム	(g(カ匁)/トン)	1.迅速定量法 2.迅速定量法 (フローインジェクション法) 3.液体クロマトグラフ法 LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 4.微生物学的定量法

## (2) B試料 分析結果

試料番号

分析成分名	分析値	備 考
水分	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
粗たん白質	(%)	1.飼料分析基準 (ケルダール法 (硫酸標準液吸収法)) 2.飼料分析基準 (ケルダール法 (ホウ酸溶液吸収法)) 3.飼料分析基準 (燃焼法) (メーカー) (型式) 4.自動分析装置 (メーカー) (型式) 5.その他の方法 ( )
粗灰分	(%)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
カドミウム	(g/トン)	1.飼料分析基準 (溶媒抽出法) 2.飼料分析基準 (簡易法) 3.その他の方法 ( )
エトキシキン	(g/トン)	1.飼料分析基準 測定条件 LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 2.その他の方法 ( )

## (3) D試料 分析結果

試料番号

分析成分名	分析値	備 考
銅	(g/kg)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
亜鉛	(g/kg)	1.飼料分析基準 2.その他の方法 ( )
クエン酸 モランテル	(g/kg)	1.飼料分析基準 測定条件 LC (メーカー名) (型式) 検出器 (メーカー名) (型式) カラム (メーカー名) (型式) (内径 mm, 長さ mm, 粒度 μm) 2.その他の方法 ( )

## (4) C試料 鑑定結果

試料番号

検出原料名	混合割合	検出方法
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )
	多量 中量 少量	1:肉眼 2:酸処理 3:アルカリ処理 4:その他( )

多量…15%以上、中量…5%以上 15%未満、少量…1%以上 5%未満

注) 10 種類の原料を混合しています。

#### 検出原料名の選択肢

大麦	えん麦	ライ麦	小麦	小麦粉
とうもろこし	マイロ	玄米	精白米	キャッサバ
ふすま	麦ぬか	米ぬか	ビールかす	コーングルテンフィード
スクリーニングペレット	ホミニーフード	コーングルテンミール	あまに油かす	サフラワー油かす
なたね油かす	綿実油かす	やし油かす	ごま油かす	大豆油かす
カポック油かす	肉骨粉	フェザーミール	チキンミール	魚粉
アルファルファミール	ビートパルプ	パイナップルかす	尿素	かに殻粉末
かき殻	ゼオライト	食塩	炭酸カルシウム	リン酸カルシウム

(5) 来年度の実施項目等「飼料等の共通試料による分析鑑定」に関して、意見、質問、要望等があれば記入してください。(別紙でも可)

**調査資料****1 飼料中の有害物質等のモニタリング等の結果について（平成 28 年度）****Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2016)**

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課  
飼料鑑定第二課

**1 目 的**

飼料等の使用が原因となって、有害畜産物（家畜等の肉、乳、その他の食用に供される生産物で人の健康をそこなうおそれがあるもの）が生産され、又は家畜等に被害が生じることにより畜産物の生産が阻害されることを防止する見地から、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律<sup>1)</sup>（以下「飼料安全法」という。）第3条第1項の規定に基づき、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令<sup>2)</sup>（以下「成分規格等省令」という。）において、飼料中の有害物質等の成分規格（以下「省令基準値」という。）が定められ、また、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準<sup>3)</sup>（以下「指導基準等通知」という。）において、飼料中の有害物質等の指導基準値及び管理基準値（以下「指導基準値等」という。）が定められている。

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という。）では、飼料分析基準<sup>4)</sup>等に規定された方法を用いて、省令基準値及び指導基準値等の適合状況のモニタリング及び省令基準値、指導基準値等が設定されていない有害物質等の含有実態を把握するためのサーベイランス（以下「モニタリング等」という。）を実施している。今回、平成 28 年度のモニタリング等の結果を取りまとめたので報告する。

**2 方 法****2.1 モニタリング等の対象試料**

平成 28 年 4 月から平成 29 年 3 月までの間に、FAMIC 肥飼料安全検査部、札幌センター、仙台センター、名古屋センター、神戸センター及び福岡センターが、飼料安全法第 57 条の規定に基づき、単体飼料工場、配混合飼料工場、港湾サイロ等に対して立入検査を実施した際に採取した飼料等を対象とした。

モニタリング等の対象とした試料及び点数を表 1 に示した。

**2.2 モニタリング等の対象成分**

以下の成分をモニタリング等の対象とした。なお、各試料に対するモニタリング等実施成分の選定にあたっては、飼料の原産国、過去の検出実態等を勘案するとともに、配混合飼料の対象家畜等、使用されている原料等にも留意した。

**1) 有害物質****i かび毒及びエンドファイト産生毒素（28 成分）****ア 指導基準値等が定められているもの（3 成分）**

とうもろこし及び配混合飼料に指導基準値又は管理基準値が定められているアフラトキシン B<sub>1</sub>、家畜用飼料に管理基準値が定められているゼアラレノン及び家畜等用飼料に管

理基準値が定められているデオキシニバレノールを対象とした。

イ ア以外のかび毒等（25 成分）

飼料分析基準に方法が規定されている以下のかび毒 23 成分及びエンドファイト産生毒素 2 成分を対象とした。

かび毒：アフラトキシン B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, ステリグマトシスチン, HT-2 トキシン, T-2 トキシン, ネオソラニオール, フザレノン-X, 3-アセチルデオキシニバレノール, 15-アセチルデオキシニバレノール, ニバレノール, フモニシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, オクラトキシン A, シトリニン,  $\alpha$ -ゼアララノール,  $\beta$ -ゼアララノール, ゼアララノン,  $\alpha$ -ゼアラレノール,  $\beta$ -ゼアラレノール, ジアセトキシシルペノール及びデオキシニバレノール-3-グルコシド

エンドファイト産生毒素：エルゴバリン及びロリトレム B

ii 重金属等（4 成分）

管理基準値が定められているカドミウム, 水銀, 鉛及びび素を対象とした。

iii 農薬（130 成分）

ア 省令基準値が定められているもの

成分規格等省令別表第 1 の 1 の(1)に省令基準値が定められている農薬 61 成分のうちの 39 成分を対象とした。

イ ア以外農薬

飼料分析基準に方法が規定されている農薬のうちの 91 成分を対象とした。

iv その他の有害物質（4 成分）

管理基準値が定められているメラミンのほか, 指導基準値等は定められていないが, 飼料中に含まれて問題を起す可能性のある以下の有害物質 3 成分を対象とした。

ア 硝酸態窒素

イ 亜硝酸態窒素

ウ ヒスタミン

2) BSE 発生防止に係る成分

i 動物由来たん白質

成分規格等省令別表第 1 の 2 に規定された牛等を対象とする飼料, 動物由来たん白質又は動物由来たん白質を原料とする飼料中のほ乳動物等由来たん白質を対象とした。

ii 不溶性不純物

成分規格等省令別表第 1 の 5 の(1)に規定された動物性油脂及び特定動物性油脂を対象とした。

3) 病原微生物（サルモネラ）

配混合飼料及び単体飼料を対象とした。

表 1 モニタリング等を実施した試料及び点数

種類	試料 点数	項目別の試料点数											
		有害物質					BSE発生防止に係る試験			病原微生物			
		かび毒	重金属	農薬	メラミン	硝酸態・ 亜硝酸 態窒素	ヒスタミ ン	動物由来たん白質			不溶性 不純物	サルモ ネラ	
						顕微鏡 鑑定	ELISA 試験	PCR 試験					
幼すう育成用	4	4	2	1									1
中すう育成用	6	4	2	6									1
大すう育成用	2	2	2										
成鶏飼育用	56	36	24	27									9
種鶏飼育用	3	2	2	3									
ブロイラー肥育前期用	8	5	1	5									1
ブロイラー肥育後期用	15	10	4	7									3
鶏複数ステージ用	2	1	1										
ほ乳期子豚育成用	13	10	5	5									2
子豚育成用	15	10	4	10									2
肉豚肥育用	18	11	11	5									3
種豚育成用	5	3	1	1									2
種豚飼育用	16	7	2	10									3
豚複数ステージ用	2	2	1										1
配 混 合 飼 料													
ほ乳期子牛育成用代用乳用	4	4	2	3			4						1
ほ乳期子牛育成用	5	4	2	1			5	5	5				1
若令牛育成用	7	1	2	3			7	7	7				1
乳用牛飼育用	49	39	13	18			49	43	43				10
幼令肉用牛育成用	2	2	2				2	2	2				
肉用牛肥育用	36	15	6	17			34	30	30				7
乳用牛飼育用	1	1	1				1	1	1				
肉牛繁殖用	6	5	1	1			6	6	6				1
牛複数ステージ用	26	18	2	8			26	17	17				
魚用	15				15								1
とうもろこし・魚粉二種混合飼料	3		3										
二種混合飼料(上記以外のもの)	3		2										1
動物性たん白質混合飼料	14						14	14	14				4
フィッシュソリュブル吸着飼料	1						1	1	1				
糖蜜吸着飼料	1						1	1	1				
上記以外の混合飼料	43						42	42	42				1
小計	381	197	96	135	15		195	172	172				56
穀類													
大麦	1	1		1									
圧ぺん大麦	1	1		1									
きな粉	2	1		2									
小麦	9	9		4									
小麦粉	6	5		3									
玄米	3	3											
末粉	3	1		3									
とうもろこし	51	51		51									
マイロ	4	2		4									
小計	80	74		69									
そう こ う 類													
あわぬか	1	1		1									
米ぬか	1			1									
米ぬか油かす	13	11		9									2
コーングルテンフィード	25	15		22									1
大豆皮	1			1									
とうもろこしジスチラーズグレイソリュブル (DDGS)	10	5		9									
ビールかす	1			1									
ふすま	43	32		34									7
ホミニーフィード	3	1		3									
麦ぬか	1			1									1
小計	99	65		82									11
植物性 油 か す 類													
エゴマミール	1			1									
小麦グルテン酵素分解物	1			1									
コーングルテンミール	6	1		5									1
コーンジャムミール	1	1		1									
加糖加熱大豆油かす	1	1		1									
ごま油かす	2	1		1									1
大豆油かす	55	39		49			1	1	1				1
なたね油かす	26	9		26									1
濃縮大豆たん白	1	1		1									
パーム油かす	1			1									
やし油かす	1	1		1									
小計	96	54		88			1	1	1				4

表 1 モニタリング等を実施した試料及び点数（続き）

モニタリング等の対象試料	種類	試料 点数	項目別の試料点数										
			有害物質					BSE発生防止に係る試験			病原微生物		
			かび毒	重金属	農薬	メラミン	硝酸態・ 亜硝酸 態窒素	ヒスタミ ン	動物由来たん白質			不溶性 不純物	サルモ ネラ
						顕微鏡 鑑定	ELISA 試験	PCR 試験					
動物 質性 飼料	えび粉末	2						2	2	2			
	おきあみ粉末	1						1	1	1			
	かに殻粉末	1						1	1	1			
	チキンミール	30		2				30	30	30		9	
	魚粉	81		21		9		11	81	81	81	27	
	肉骨粉(ボークミール)	2		1					2	2		2	
	原料混合肉骨粉	24							24	24		2	
	蒸製骨粉	1							1	1			
フェザーミール	17							17	17	17	8		
小計	159		24		9		11	132	159	159		48	
乾 牧 草	アルファルファ	7		1	7			6					
	稲わら	3		3									
	ウイートヘイ(麦わらを含む。)	3		3	3								
	オーツヘイ	4		2	4								
	クレイングラス	1			1								
	スーダングラス	6		3	6			4					
	チモシー	7		4	7								
	バミューダグラス	3		2	3								
	フェスク	2	2	1	2								
	小計	36	2	19	33			10					
そ の 他	海藻ミール	2							2	2	2		
	乾燥酵母細胞壁	1							1	1	1		
	飼料用酵母	2							2	2	2		
	動物性油脂	74										74	
	特定動物性油脂	1										1	
	ビートパルプ	1	1		1								
綿実	2	2		2									
小計	83	3		3				5	5	5		75	
合計	934	395	139	410	24	10	11	333	337	337		75	119

### 2.3 サンプルング方法等

#### 1) 有害物質及び病原微生物の分析用試料

試料は、飼料等検査実施要領<sup>5)</sup>により、採取、保管した。とうもろこし及び牧草は、飼料中の農薬の検査に係る通知<sup>6)</sup>により、採取した。

分析用試料は、飼料分析基準第2章の規定により調製した。

#### 2) 動物由来たん白質等の分析用試料

試料は、飼料分析基準第16章第1節の規定により、採取、保管及び調製した。

#### 3) 不溶性不純物の分析用試料

基準油脂分析試験法<sup>7)</sup>の試料採取方法に準拠した次の方法<sup>8)</sup>により採取した。

動物性油脂を積み込んだタンクローリー車の上部のふたを開け、ポンプサンプラー（容量約300 mL）を用いてハッチの上部、中部及び下部の3箇所から動物性油脂を採取し、これらを混合して試料とした。

### 2.4 試験方法

#### 1) 有害物質

##### i かび毒及びエンドファイト産生毒素

飼料分析基準第5章に規定された方法により実施した。

##### ii 重金属等

飼料分析基準第4章第1節に規定された方法により実施した。

## iii 農 薬

飼料分析基準第 6 章に規定された方法により実施した。

## iv メラミン

飼料分析基準第 7 章 7.1 に規定された方法により実施した。

## v 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

飼料分析基準第 4 章第 2 節 3 に規定された方法により実施した。

## vi ヒスタミン

飼料分析基準第 7 章 5.1 に規定された方法により実施した。

## 2) 飼料への動物由来たん白質等の混入確認

以下の 3 法を併用して実施した。なお、混入確認の結果は、牛を対象とする飼料の抽出検査の取扱いに係る事務連絡<sup>9)</sup>の判定手順(例)(以下「混入確認判定手順」という。)に基づき、総合的に判定した。

## i 顕微鏡鑑定

飼料分析基準第 19 章 1.1 比重分別及び 1.2 顕微鏡検査を応用した鑑定方法<sup>10)</sup>により、獣骨(肉骨粉由来組織)の有無を確認した。鑑定方法の概要を図 1 に示した。

## ii ELISA 試験

飼料分析基準第 17 章第 2 節 1.1 の(3)に規定された方法により実施した。

## iii PCR 試験

魚粉等及び牛用配混合飼料は、飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 に規定された方法により、ほ乳動物由来 DNA を対象に混入の有無を確認した。チキンミール等、肉骨粉等及び輸入飼料の一部は、飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.2 に規定された方法により、反すう動物由来 DNA を対象に混入の有無を確認した。なお、乳製品等が原料として使用又は混入の可能性のある試料は、飼料分析基準第 16 章第 2 節 1.1 付記に規定された方法により、乳製品等除去処理を行った後、上記試験を実施した。

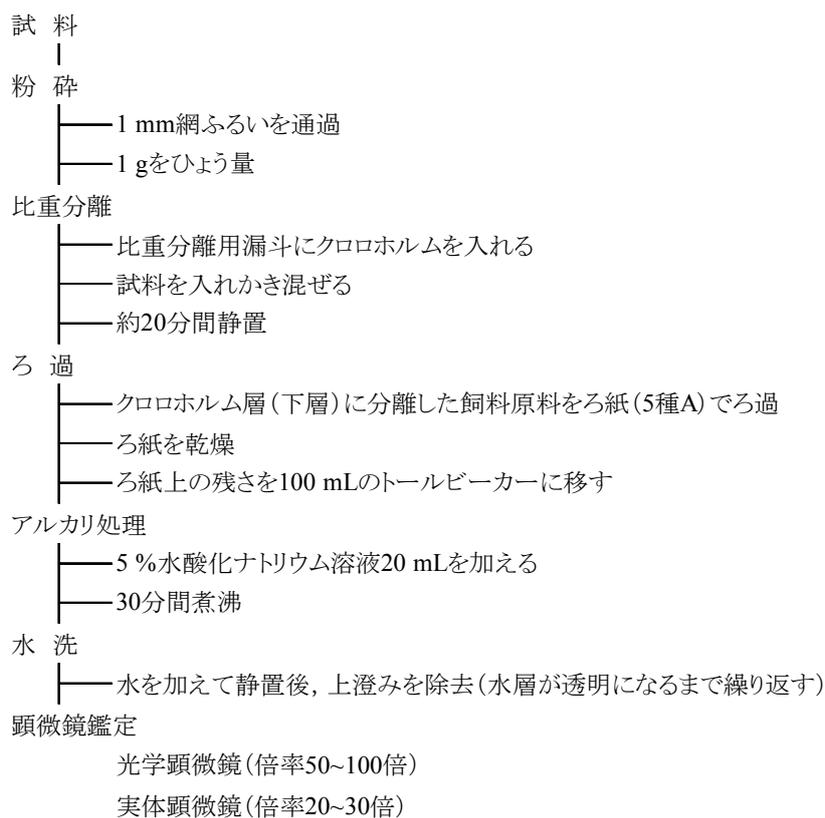


図 1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

## 3) 不溶性不純物

成分規格等省令別表第 1 の 5 の (1) のアに規定された方法により実施した。

## 4) サルモネラ

飼料分析基準第 18 章 1 に規定された方法により実施した。なお、分離したサルモネラは、血清型別を実施した。

## 3 結 果

## 3.1 有害物質

## 1) かび毒及びエンドファイト産生毒素

配混合飼料 197 点，単体飼料 198 点及び乾牧草 2 点に対し，指導基準値等が定められているアフラトキシン B<sub>1</sub>，ゼアラレノン及びデオキシニバレノールを含む計 28 成分について，のべ 5823 点のモニタリング等を実施した。

指導基準値等が定められている 3 成分のモニタリング等の結果を表 2-1 に，指導基準値等が定められていないかび毒及びエンドファイト産生毒素のモニタリング等の結果を表 2-2 に示した。主なかび毒についての結果は，以下のとおりであった。

i アフラトキシン B<sub>1</sub>

配混合飼料 179 点中 16 点から検出され（検出率 8.9 %），検出されたものの最大値は，0.022 mg/kg，平均値は 0.0020 mg/kg であり，指導基準値（乳用牛用 0.01 mg/kg）及び管理基準値（幼すう用，ブロイラー前期用，ほ乳期子豚用及びほ乳期子牛用は 0.01 mg/kg，それ以

外の配混合飼料は 0.02 mg/kg. ) を超えるものはなかった.

とうもろこし 51 点中 16 点から検出され (検出率 31 %) , 検出されたものの最大値は 0.037 mg/kg, 平均値は 0.0061 mg/kg であり, 管理基準値 (0.02 mg/kg) を超えたものが 1 点 (0.037 mg/kg) あった.

また, とうもろこしの加工副産物 (DDGS) 3 点からは検出されなかった.

ii ゼアラレノン

配混合飼料 179 点中 172 点から検出され (検出率 96 %) , 最大値は 0.33 mg/kg, 平均値は 0.034 mg/kg であり, 管理基準値 (家畜用飼料で 1 mg/kg) を超えるものはなかった.

単体飼料の指導基準値等は定められていないが, とうもろこし 49 点中 47 点から検出され (検出率 96 %) , 検出されたものの最大値は 0.15 mg/kg, 平均値は 0.031 mg/kg であった.

iii デオキシニバレノール

配混合飼料 179 点中 158 点から検出され (検出率 88 %) , 検出されたものの最大値は 0.85 mg/kg, 平均値は 0.20 mg/kg であり, 管理基準値 (生後 3 ヶ月以上の牛を除く家畜等用飼料は 1 mg/kg, 生後 3 ヶ月以上の牛用飼料は 4 mg/kg) を超えるものはなかった.

単体飼料の指導基準値等は定められていないが, とうもろこし 49 点中 45 点から検出され (検出率 92 %) , 検出されたものの最大値は 0.97 mg/kg, 平均値は 0.30 mg/kg であった. とうもろこしの加工副産物の一部では定量値の高いものがあり, 1 mg/kg を超えて検出されたものは, コーングルテンフィード 9 点中 7 点 (最大値 4.3 mg/kg) 及び DDGS 2 点中 1 点 (1.1 mg/kg) であった.

上記以外では, 小麦, 小麦粉及び末粉計 15 点中 13 点から検出され, 検出されたものの最大値は 2.9 mg/kg, 平均値は 0.36 mg/kg であった. また小麦の加工副産物であるふすま 32 点中 32 点から検出され (検出率 100 %) , 最大値は 1.3 mg/kg, 平均値は 0.39 mg/kg であった.

表2-1 指導基準値等が定められているかび毒のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象試料	アフラトキシンB <sub>1</sub> (検出下限 0.0003 mg/kg)						ゼアラレノン (検出下限 0.0003 mg/kg)						デオキシニバレノール (検出下限 0.01 mg/kg)								
	管理/指導基準値 (mg/kg)		うち検出されたもの		管理基準値 (mg/kg)		うち検出されたもの		管理基準値 (mg/kg)		うち検出されたもの		管理基準値 (mg/kg)		うち検出されたもの						
	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試験点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)					
(アフラトキシンB <sub>1</sub> のみ)																					
配合飼料(乳用牛用)	50	4	8.0	0.0007	0.0005	179	16	8.9	0.022	0.0020	179	172	96	0.33	0.034	179	158	88	0.85	0.20	
配合飼料	27	3	11	0.0020	0.0009	120	114	95	0.33	0.035	117	111	95	0.50	0.22						
(表外 <sup>1)</sup> に示す飼料)																					
配合飼料	101	8	7.9	0.022	0.0030	58	57	98	0.28	0.031	4	70	65	93	1.5	0.38					
(上記以外の配合飼料)																					
その他の混合飼料	1	0	0			1	1	100	0.18	0.018	-	1	1	100	0.46	0.46					
配合飼料小計	179	16	8.9	0.022	0.0020	179	172	96	0.33	0.034	179	158	88	0.85	0.20						
とうもろこし	51	16	31	0.037	0.0061	49	47	96	0.15	0.031	-	49	45	92	0.97	0.30					
コーン・グルテン・オフロード	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9	100	4.3	1.5					
DDGS	3	0	0			-	-	-	-	-	-	2	2	100	1.1	0.77					
マイロ	2	0	0			2	2	100	0.50	0.29	-	2	2	100	0.22	0.14					
大麦	1	0	0			1	1	100	0.002	0.002	-	1	1	100	0.022	0.022					
圧・ペん大麦	1	0	0			1	1	100	0.0007	0.0007	-	1	1	100	0.055	0.055					
小麦	8	0	0			8	5	63	0.054	0.014	-	9	7	78	2.9	0.52					
小麦粉	5	0	0			5	4	80	0.050	0.015	-	5	5	100	0.34	0.18					
米粉	1	0	0			1	0	0			-	1	1	100	0.15	0.15					
ふすま	29	0	0			29	23	79	0.019	0.005	-	32	32	100	1.3	0.39					
玄米(新規需要米)	3	0	0			3	1	33	0.006	0.006	-	3	1	33	0.016	0.016					
米ぬか・油かす	8	0	0			8	8	100	0.012	0.004	-	6	3	50	0.021	0.017					
大豆油かす	36	2	6	0.0020	0.0012	36	35	97	0.060	0.012	-	39	5	13	0.22	0.090					
加糖加熱大豆油かす	1	0	0			1	1	100	0.005	0.005	-	1	0	0							
濃縮大豆たん白	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0							
きな粉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0							
あわぬか	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	100	0.024	0.024					
ごま油かす	-	-	-	-	-	-	1	0	0		-	1	0	0							
なたね油かす	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	2	22	0.34	0.18					
ピーナツバシ	1	0	0			1	1	100	0.029	0.029	-	1	0	0							
綿実	2	0	0			2	1	50	0.015	0.015	-	2	0	0							
やし油かす	-	-	-	-	-	-	1	0	0		-	1	0	0							
総計	331	34	10			326	302	93			356	275	77								

1) 該当する配合飼料の種類は以下のとおり。

アフラトキシンB<sub>1</sub>: 幼すう用、ブローラー肥育前期用、ほ乳期子豚用及びほ乳期子牛用  
 ゼアラレノン: 家畜(豚及び牛)用  
 デオキシニバレノール: 家畜等(鶏、豚及び牛(生後3ヶ月以上の牛を除く。))用

表 2-2 指導基準値等が定められていないかび毒及びエンドファイト産生毒素の  
モニタリング等の結果

モニタリング等の対象成分	検出下限* (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			
			点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
アフラトキシンB <sub>2</sub>	0.0003	331	5	1.5	0.004	0.002
アフラトキシンG <sub>1</sub>	0.0003	331	8	2.4	0.010	0.003
アフラトキシンG <sub>2</sub>	0.0003	331	1	0.3	0.001	0.001
ステリグマトシスチン	0.0003	323	84	26	0.009	0.001
HT-2トキシシ	0.002	38	21	55	0.016	0.009
T-2トキシシ	0.002	356	37	10	0.021	0.006
ネオソラニオール	0.002	356	1	0.3	0.011	0.011
ジアセトキシスシルペノール	0.002	38	0	0		
フザレノン-X	0.003	356	0	0		
ニバレノール	0.002	298	27	9.1	0.10	0.031
3-アセチルデオキシニバレノール	0.006	38	0	0		
15-アセチルデオキシニバレノール	0.006	38	10	26	1.1	0.27
デオキシニバレノール-3-グルコシド	0.002	38	17	45	0.39	0.12
フモニシンB <sub>1</sub>	0.0006	80	77	96	2.4	0.23
フモニシンB <sub>2</sub>	0.0006	80	74	93	0.72	0.068
フモニシンB <sub>3</sub>	0.0006	80	76	95	0.33	0.030
オクラトキシンA	0.002	54	3	6	0.021	0.014
シトリニン	0.007	10	0	0		
$\alpha$ -ゼアララノール	0.002	326	0	0		
$\beta$ -ゼアララノール	0.002	326	0	0		
ゼアララノン	0.002	326	6	1.8	0.008	0.003
$\alpha$ -ゼアラレノール	0.003	326	7	2.1	0.014	0.008
$\beta$ -ゼアラレノール	0.003	326	17	5.2	0.016	0.006
エルゴバリン	0.01	2	1	50	0.031	0.031
ロリトレムB	0.01	2	0	0		

\* 複数の試験法がある成分については、低い方の検出下限を記載した。

## 2) 重金属等

カドミウム及び鉛について、管理基準値の定められている配混合飼料，乾牧草等及び魚粉等（魚粉，チキンミール及び肉骨粉）計 128 点のモニタリング等を実施した。水銀について、管理基準値の定められている配混合飼料，乾牧草等及び魚粉等計 126 点のモニタリング等を実施した。また、ひ素について、管理基準値の定められている配混合飼料，乾牧草等及び魚粉等計 42 点のモニタリング等を実施した。その結果を表 3 に示した。

結果の概要は、以下のとおりであった。

### i) カドミウム

配混合飼料 93 点中 61 点から検出され（検出率 66 %），検出されたものの最大値は 0.21 mg/kg，平均値は 0.10 mg/kg であった。乾牧草等 12 点中 7 点から検出され（検出率 58 %），検出されたものの最大値は 0.15 mg/kg，平均値は 0.09 mg/kg であった。いずれも管理基準値

(1 mg/kg) を超えるものはなかった。

動物質性飼料では、魚粉では 20 点全てから検出され、最大値は 2.3 mg/kg、平均値は 0.81 mg/kg であった。チキンミール 2 点からは検出されず、肉骨粉 1 点からは 0.04 mg/kg が検出された。いずれも、管理基準値 (3 mg/kg) を超えるものはなかった。

## ii 水銀

配混合飼料 91 点中 43 点から検出され (検出率 47 %)、検出されたものの最大値は 0.11 mg/kg、平均値は 0.03 mg/kg であった。乾牧草 12 点中 9 点から検出され (検出率 75 %)。検出されたものの最大値は 0.08 mg/kg、平均値は 0.04 mg/kg であった。いずれも管理基準値 (0.4 mg/kg) を超えるものはなかった。

動物質性飼料では、魚粉では 20 点全てから検出され、最大値は 0.67 mg/kg、平均値は 0.29 mg/kg であった。チキンミールでは 2 点全てから検出され、最大値は 0.03 mg/kg、平均値は 0.03 mg/kg であった。肉骨粉 1 点からは検出されなかった。いずれも管理基準値 (1 mg/kg) を超えるものはなかった。

## iii 鉛

配混合飼料 93 点中 16 点から検出され (検出率 17 %)、検出されたものの最大値は 1.3 mg/kg、平均値は 0.4 mg/kg であった。乾牧草等 12 点中 2 点から検出され (検出率 17 %)、検出されたものの最大値は 1.8 mg/kg、平均値は 1.1 mg/kg であった。いずれも管理基準値 (3 mg/kg) を超えるものはなかった。

動物質性飼料では、魚粉 20 点中 10 点から検出され (検出率 50 %)、検出されたものの最大値は 4.7 mg/kg、平均値は 1.2 mg/kg であった。チキンミール 2 点及び肉骨粉 1 点からは検出されなかった。いずれも、管理基準値 (7 mg/kg) を超えるものはなかった。

## iv ひ素

配混合飼料 19 点中 12 点から検出され (検出率 63 %)、検出されたものの最大値は 0.58 mg/kg、平均値は 0.17 mg/kg であった。稲わらを除く乾牧草等 3 点中 2 点から検出され (検出率 67 %)、検出されたものの最大値は 0.46 mg/kg、平均値は 0.29 mg/kg であった。いずれも管理基準値 (2 mg/kg) を超えるものはなかった。

稲わらでは 3 点全てから検出され、最大値は 6.0 mg/kg、平均値は 5.0 mg/kg であり、管理基準値 (7 mg/kg) を超えるものはなかった。動物質性飼料では、魚粉では 15 点全てから検出され、最大値は 6.6 mg/kg、平均値は 4.6 mg/kg であった。チキンミール 1 点からは 0.06 mg/kg が検出された。いずれも管理基準値 (魚粉は 15 mg/kg、チキンミールは 7 mg/kg) を超えるものはなかった。

表 3 重金属等のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象成分	管理基準値 (mg/kg)	モニタリング等の対象試料	試料点数	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	
カドミウム	1	配混合飼料	93	61	66	0.21	0.10	0.03
		乾牧草等	12	7	58	0.15	0.09	
	3	魚粉	20	20	100	2.3	0.81	
		チキンミール	2	0	0			
		肉骨粉	1	1	100	0.04	0.04	
	総 計		128	89	70	2.3	0.26	
水銀	0.4	配混合飼料	91	43	47	0.11	0.03	0.01
		乾牧草等	12	9	75	0.08	0.04	
	1	魚粉	20	20	100	0.67	0.29	
		チキンミール	2	2	100	0.03	0.03	
		肉骨粉	1	0	0			
	総 計		126	74	59	0.67	0.10	
鉛	3	配混合飼料	93	16	17	1.3	0.4	0.2
		乾牧草等	12	2	17	1.8	1.1	
	7	魚粉	20	10	50	4.7	1.2	
		チキンミール	2	0	0			
		肉骨粉	1	0	0			
	総 計		128	28	22	4.7	0.7	
ひ素	2	配混合飼料	19	12	63	0.58	0.17	0.05
		乾牧草等 (稲わらを除く)	3	2	67	0.46	0.29	
	7	稲わら	3	3	100	6.0	5.0	
		魚粉	15	15	100	6.6	4.6	
		チキンミール	1	1	100	0.06	0.06	
	15	肉骨粉	1	1	100	0.10	0.10	
総 計		42	34	81	6.6	2.6		

## 3) 農 薬

飼料等 409 点に対し、省令基準値が定められている 39 成分及び省令基準値が定められていない農薬 91 成分の計 130 成分について、のべ 47825 点のモニタリング等を実施した。その結果を表 4 及び表 5 に示した。

省令基準値を超過したものはなかった。

全般に、とうもろこし、麦類及びその加工副産物を中心に有機リン系農薬の検出率が高く、牧草では、検出率は低いものの多種類の農薬が検出された。結果の概要は以下のとおりであった。

## i) ピリミホスメチル

省令基準値が定められている穀類 3 種類 44 点について、モニタリング等を実施した結果、大麦からは検出されなかった。とうもろこしは 39 点中 3 点から検出され (検出率 7.7 %、最大値 0.26 mg/kg)、マイロは 4 点中 1 点から検出された (検出率 25 %、最大値 0.36 mg/kg) が、省令基準値を超えるものはなかった。

また、配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 338 点について、モニタリング等を実施した結果、42 点から検出された。その内訳は、大豆油かす 39 点中 1 点（検出率 3 %，0.088 mg/kg），コーングルテンフィード 22 点中 1 点（検出率 5 %，0.023 mg/kg）コーンジャムミール 1 点中 1 点（0.053 mg/kg），小麦グルテン酵素分解物 1 点中 1 点（0.90 mg/kg），配混合飼料 135 点中 38 点（検出率 28 %，最大値 0.56 mg/kg（乳用牛飼育用））であった。

#### ii クロルピリホスメチル

省令基準値が定められている穀類 3 種類 44 点について、モニタリング等を実施した結果、大麦及びとうもろこしからは検出されなかった。マイロでは 4 点中 1 点から検出された（検出率 25 %，0.20 mg/kg）が、省令基準値を超えるものはなかった。

また、配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 338 点について、モニタリング等を実施した結果、31 点から検出された。その内訳は、ふすま 34 点中 11 点（検出率 32 %，最大値 0.11 mg/kg），小麦粉 3 点中 1 点（検出率 33 %，0.089 mg/kg），なたね油かす 26 点中 1 点（検出率 4 %，0.043 mg/kg），綿実 2 点中 1 点（検出率 50 %，0.033 mg/kg），配混合飼料 135 点中 17 点（検出率 13 %，最大値 0.34 mg/kg（子豚育成用））であった。

#### iii マラチオン

省令基準値が定められている穀類 3 種類 44 点及び牧草 32 点について、モニタリング等を実施した結果、いずれも検出されなかった。

また、配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 306 点について、モニタリング等を実施した結果、11 点から検出された。その内訳は、ふすま 34 点中 5 点（検出率 15 %，最大値 0.13 mg/kg），コーングルテンフィード 22 点中 2 点（検出率 9 %，最大値 0.12 mg/kg），小麦粉 3 点中 1 点（検出率 33 %，0.054 mg/kg），配混合飼料 135 点中 3 点（検出率 2 %，0.14 mg/kg（牛複数ステージ用））であった。

#### iv クロルピリホス

省令基準値が定められている穀類 3 種類 44 点及び牧草 32 点について、モニタリング等を実施した結果、大麦，とうもろこし及び牧草からは検出されなかった。マイロでは 4 点中 1 点から検出（検出率 25 %，0.22 mg/kg）されたが、省令基準値を超えるものはなかった。

また、配混合飼料を中心に省令基準値が定められていない飼料 306 点について、モニタリング等を実施した結果、3 点から検出された。その内訳は、配混合飼料 135 点中 3 点（検出率 2 %，最大値 0.072 mg/kg（混合飼料））であった。

#### v その他の検出された農薬

##### ① 穀類

2,4-D（とうもろこし），アトラジン（マイロ）及びフェニトロチオン（とうもろこし）

##### ② 乾牧草

シハロトリン（アルファルファ及びスーダングラス），ビフェントリン（フェスク），プロパニル（アルファルファ），プロピコナゾール（フェスク）及びペンディメタリン（チモシー）

##### ③ 原料

EPN（DDGS），イソプロチオラン（米ぬか），グリホサート（大豆油かす），グルホ

シネート（大豆油かす），デルタメトリン及びトラロメトリン（ふすま）並びにフェノトリン（ふすま）

④ 配混合飼料

クロルプロファム，デルタメトリン及びトラロメトリン，ピフェントリン並びにフェニトロチオン

表4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	試料点数	うち検出されたもの			検出下限 (mg/kg)	
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)		平均値 (mg/kg)
γ-BHC(リンデン)	配混合飼料(鶏・うずら、豚用)	0.05	81	0	0		0.005	
	配混合飼料(牛等用)	0.4	53	0	0			
	牧草	0.4	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	221	0	0			
	計	—	387	0	0			
2,4-D	とうもろこし	0.05	5	1	20	0.004	0.004	0.003
	マイロ	0.5	2	0	0			0.003
	牧草	260	8	0	0			2
	計	—	15	1	6.7	0.004	0.004	
BHC	配混合飼料	0.005	134	0	0			0.005
	牧草	0.02	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	221	0	0			
	計	—	387	0	0			
DDT	配混合飼料	0.1	134	0	0			0.02
	牧草	0.1	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	221	0	0			
	計	—	387	0	0			
アトラジン	大麦	0.02	1	0	0			0.02
	とうもろこし	0.2	39	0	0			
	マイロ	0.02	4	1	25	0.021	0.021	
	牧草	15	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	306	0	0			
計	—	382	1	0.3	0.021	0.021		
アラクロール	とうもろこし	0.02	39	0	0			0.02
	マイロ	0.05	4	0	0			
	牧草	0.05	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	312	0	0			
計	—	387	0	0				
アルドリン及び ディルドリン	配混合飼料	0.02	134	0	0			0.02
	牧草	0.02	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	221	0	0			
	計	—	387	0	0			
イソフェンホス	とうもろこし	0.02	39	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	348	0	0			
	計	—	387	0	0			
エチオン	牧草	20	32	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	355	0	0			
	計	—	387	0	0			

表 4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分，続き）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	試料点数	うち検出されたもの			検出下限 (mg/kg)	
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)		平均値 (mg/kg)
エンドリン	配混合飼料	0.01	134	0	0		0.01	
	牧草	0.01	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	221	0	0			
	計	—	387	0	0			
キャプタン	とうもろこし	10	11	0	0		0.03	
グリホサート	大豆油かす(基準値なし)	—	15	15	100	3.6	1.8	0.01
グルホシネート	大豆油かす(基準値なし)	—	15	13	87	0.27	0.10	0.02
クロルピリホス	大麦	0.2	1	0	0			0.01
	とうもろこし	0.1	39	0	0			
	マイロ	0.75	4	1	25	0.22	0.22	
	牧草	13	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	306	3	1.0	0.072	0.050	
計	—	382	4	1.0	0.22	0.093		
クロルピリホスメチル	大麦	7	1	0	0			0.02
	とうもろこし	7	39	0	0			
	マイロ	10	4	1	25	0.20	0.20	
	基準値のない飼料	—	338	31	9.2	0.34	0.078	
計	—	382	32	8.4	0.34	0.082		
クロルフェンビンホス	とうもろこし	0.05	39	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	344	0	0			
	計	—	383	0	0			
クロルプロファム	大麦	0.05	1	0	0			0.02
	とうもろこし	0.05	39	0	0			
	基準値のない飼料	—	342	1	0.3	0.024	0.024	
	計	—	382	1	0.3	0.024	0.024	
クロルベンジレート	とうもろこし	0.02	39	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	348	0	0			
	計	—	387	0	0			
ジカンバ	大豆油かす	10	4	0	0			0.3
シハロトリン	大麦	0.2	1	0	0			0.02
	とうもろこし	0.04	39	0	0			
	マイロ	0.2	4	0	0			
	牧草	0.6	32	2	6.3	0.41	0.24	
	基準値のない飼料	—	306	0	0			
計	—	382	2	0.5	0.41	0.24		
シマジン	とうもろこし	0.3	4	0	0			0.007
ジメトエート	大麦	0.04	1	0	0			0.02
	とうもろこし	1	39	0	0			
	マイロ	0.2	4	0	0			
	牧草	2	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	306	0	0			
計	—	382	0	0				
ダイアジノン	大麦	0.1	1	0	0			0.02
	とうもろこし	0.02	39	0	0			
	マイロ	0.1	4	0	0			
	牧草	10	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	306	0	0			
計	—	382	0	0				

表4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分，続き）

モニタリング等の対象成分	モニタリング等の対象試料	省令基準値 (mg/kg)	試料点数	うち検出されたもの			検出下限 (mg/kg)	
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)		平均値 (mg/kg)
デルタメトリン及び トラロメトリン	大麦	1	1	0	0		0.03	
	とうもろこし	1	39	0	0		0.03	
	マイロ	1	4	0	0		0.03	
	牧草	5	32	0	0		0.045	
	基準値のない飼料	—	306	4	1.3	0.17	0.085	0.03
	計	—	382	4	1.0	0.17	0.085	
テルブホス	大麦	0.01	1	0	0			
	とうもろこし	0.01	39	0	0			
	マイロ	0.05	4	0	0		0.005	
	牧草	1	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	306	0	0			
	計	—	382	0	0			
パラチオン	大麦	0.5	1	0	0			
	とうもろこし	0.3	39	0	0			
	マイロ	0.08	4	0	0		0.02	
	牧草	5	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	306	0	0			
	計	—	382	0	0			
ピリメホスメチル	大麦	1	1	0	0			
	とうもろこし	1	39	3	8	0.26	0.17	
	マイロ	1	4	1	25	0.36	0.36	0.02
	基準値のない飼料	—	338	42	12	0.90	0.17	
	計	—	382	46	12	0.90	0.17	
フィプロニル	配混合飼料(鶏・うずら用)	0.01	50	0				
	配混合飼料(牛等、豚用)	0.02	84	0				
	牧草	0.2	32	0			0.003	
	基準値のない飼料	—	221	0				
	計	—	387	0				
フェントロチオン	大麦	5	1	0	0			
	とうもろこし	1	39	1	2.6	0.062	0.062	
	マイロ	1	4	0	0		0.02	
	牧草	10	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	306	6	2.0	0.041	0.033	
	計	—	382	7	1.8	0.062	0.037	
フェントエート	大麦	0.4	1	0	0			
	とうもろこし	0.4	39	0	0			
	マイロ	0.4	4	0	0		0.02	
	基準値のない飼料	—	338	0	0			
	計	—	382	0	0			
フェンバレレート	配混合飼料(鶏・うずら用)	0.5	50	0	0			
	配混合飼料(豚用)	4	31	0	0			
	配混合飼料(牛等用)	8	53	0	0		0.02	
	牧草	13	32	0	0			
	基準値のない飼料	—	221	0	0			
	計	—	387	0	0			
フェンプロパトリン	牧草	20	32	0				
	基準値のない飼料	—	355	0			0.02	
	計	—	387	0				

表 4 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められている成分，続き）

モニタリング等の 対象成分	モニタリング等の 対象試料	省令 基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			検出 下限 (mg/kg)
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	
ヘプタクロル	配混合飼料	0.02	134	0	0		
	牧草	0.02	32	0	0		
	基準値のない飼料	—	221	0	0		0.02
	計	—	387	0	0		
ペルメリン	大麦	2	1	0	0		
	とうもろこし	2	39	0	0		
	マイロ	2	4	0	0		
	牧草	55	32	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	306	0	0		
計	—	382	0	0			
ペンディメタリン	大麦	0.2	1	0	0		
	とうもろこし	0.2	39	0	0		
	マイロ	0.1	4	0	0		
	牧草	15	32	1	3.1	0.054	0.054
	基準値のない飼料	—	306	0	0		
計	—	382	1	0.3	0.054	0.054	
ホスメット	大麦	0.05	1	0	0		
	とうもろこし	0.05	39	0	0		
	マイロ	0.05	4	0	0		
	牧草	40	32	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	306	0	0		
計	—	382	0	0			
ホレート	大麦	0.05	1	0	0		
	とうもろこし	0.05	39	0	0		
	マイロ	0.05	4	0	0		
	牧草	1.5	32	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	306	0	0		
計	—	382	0	0			
マラチオン	大麦	2	1	0	0		
	とうもろこし	2	39	0	0		
	マイロ	2	4	0	0		
	牧草	135	32	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	306	11	3.6	0.14	0.066
計	—	382	11	2.9	0.14	0.066	
メチダチオン	大麦	0.02	1	0	0		
	とうもろこし	0.1	39	0	0		
	マイロ	0.2	4	0	0		
	牧草	12	32	0	0		0.02
	基準値のない飼料	—	306	0	0		
計	—	382	0	0			

表5 農薬のモニタリング等の結果（省令基準値が定められていない成分）

モニタリング等の対象成分	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)	モニタリング等の対象成分	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)	モニタリング等の対象成分	うち検出されたもの				検出下限 (mg/kg)
	試験点数	点数	率 (%)	最大値 (mg/kg)			平均値 (mg/kg)	試験点数	点数	率 (%)			最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)	試験点数	点数	
EPN	387	1	0.3	0.074	0.074	0.02	ターバシル	387	0	0	0.02	フルシトリンネート	387	0	0	0.02	
アセトクロール	387	0	0	0.02	0.02	0.02	チオベンカルブ	387	0	0	0.02	フルトラニル	387	0	0	0.02	
アニロホス	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テクナゼン	387	0	0	0.02	フルトリアホール	387	0	0	0.02	
アマトリン	387	0	0	0.02	0.02	0.02	ネトラクロルピホス	387	0	0	0.02	フルバリンネート	387	0	0	0.02	
アリドクロール	387	0	0	0.02	0.02	0.02	ネトラコナゾール	387	0	0	0.02	フルミオキサジン	387	0	0	0.02	
アレスリン	387	0	0	0.02	0.02	0.02	ネトラジホフ	387	0	0	0.02	フルミクロラックベンチル	387	0	0	0.02	
イサゾホス	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロシミド	387	0	0	0.02	
インプロチオラン	387	1	0.3	0.049	0.049	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
イプロベンホス	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
エタルフルリン	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
エディンホス	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
エトフェンプロックス	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
エトメセート	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
エトプロホス	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
エトリアゾール	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
エトリアゾール	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
オキサジアゾン	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
カズサホス	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
カルフェントリンエチル	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
キントゼン	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
クレノキシムメチル	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
クロルタルジメチル	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
クロルデン	259	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
クロルフェナピル	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
ジクロロプロップメチル	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
ジクロラン	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
ジフェナミド	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
ジフェンコナゾール	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
ジメテナミド	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
ジメベレネート	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	
シラフルオフェン	387	0	0	0.02	0.02	0.02	テブコナゾール	387	0	0	0.02	プロバクロー	387	0	0	0.02	

## 4) その他の有害物質

管理基準値が定められているメラミンのほか、指導基準値等は定められていないが、飼料中に多量に含まれると家畜事故を生じるおそれがあることが知られる 3 成分の有害物質について、計 71 点のモニタリング等を実施した。その結果を表 6 に示した。

各成分の結果は、以下のとおりであった。

## i メラミン

養魚用飼料及び魚粉のモニタリング等を実施した結果、養魚用配合飼料は 15 点中 2 点から検出され（検出率 13 %，最大値 0.13 mg/kg），魚粉は 9 点中 3 点から検出された（検出率 33 %，最大値 0.10 mg/kg）。いずれも管理基準値（2.5 mg/kg）を超えるものはなかった。

## ii 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素

牧草 10 点（アルファルファ 6 点，スーダングラス 4 点）のモニタリング等を実施した結果、全ての試料から硝酸態窒素が検出され、最大値は、アルファルファ，スーダングラスいずれも 800 mg/kg であった。亜硝酸態窒素が検出されたものはなかった。いずれも輸入の際の品質管理による受入れの目安<sup>11)</sup>（0.1 %）を超えるものはなかった。

## iii ヒスタミン

魚粉のモニタリング等を実施した結果、11 点中 7 点から検出（検出率 64 %，最大値 740 mg/kg）されたが、直ちに家畜事故を生じるおそれがあると認められるものはなかった。

表 6 その他の有害物質のモニタリング等の結果

モニタリング等の対象成分	管理基準値 (mg/kg)	モニタリング等の対象試料	試料点数	うち検出されたもの			検出下限 (mg/kg)	
				点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)		平均値 (mg/kg)
メラミン	2.5	養魚用配合飼料	15	2	13	0.13	0.10	0.06
		魚粉	9	3	33	0.10	0.08	
		計	24	5	21	0.13	0.09	
硝酸態窒素	—	アルファルファ	6	6	100	800	450	10
		スーダングラス	4	4	100	800	550	
		計	10	10	100	800	490	
亜硝酸態窒素	—	アルファルファ	6	0	0			10
		スーダングラス	4	0	0			
		計	10	0	0			
ヒスタミン	—	魚粉	11	7	64	740	270	3

## 3.2 飼料への動物由来たん白質等の混入確認

国内で製造された魚粉 81 点及びその他の魚介類由来たん白質 4 点，並びにチキンミール 30 点及びフェザーミール 17 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験による確認を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった。また，原料混合肉骨粉 24 点，肉骨粉（ポークミール）2 点及び蒸製骨粉 1 点について，ELISA 試験及び PCR 試験による確認を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった。なお，ELISA 試験において魚粉 1 点から牛由来たん白質が検出されたが，PCR 試験において同一試料から反すう動物由来 DNA が検出されなかったことから，混入確認判定手順に基づき，牛由来たん白質の混入は認められないと総合的に判定した。これらのモニタリング等の結果を表 7 及び表 8 に示した。

表 7 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（魚粉等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			反すう動物由来DNA			
	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	
魚粉	81	0	0	81	1	1	81	0	0	0
えび粉末	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0
おきあみ粉末	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
かに殻粉末	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0

表 8 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（チキンミール，肉骨粉等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数	
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			反すう動物由来DNA				
	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)		
チキンミール		30	0	0	30	0	0	30	0	0	0
フェザーミール		17	0	0	17	0	0	17	0	0	0
原料混合肉骨粉					24	0	0	24	0	0	0
肉骨粉（ポークミール）					2	0	0	2	0	0	0
蒸製骨粉					1	0	0	1	0	0	0

国内で製造されたほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料 4 点，ほ乳期子牛育成用配合飼料 5 点，若令牛育成用配合飼料 7 点，乳用牛飼育用配合飼料 49 点，幼令肉用牛育成用配合飼料 2 点，肉用牛肥育用配合飼料 34 点，乳肉用牛飼育用配合飼料 1 点，肉牛繁殖用配合飼料 6 点，牛複数ステージ用配合飼料 26 点，糖蜜吸着飼料 1 点及びその他の牛用混合飼料 22 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験による確認を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった。また，牛以外の畜種向けの飼料として，動物質原料を含む混合飼料等 15 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験による確認を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった。これらの結果を表 9 に示した。

輸入された牛用混合飼料 23 点，大豆油かす 1 点，海藻ミール 2 点，乾燥酵母細胞壁 1 点及び飼料用酵母 2 点について，顕微鏡鑑定，ELISA 試験及び PCR 試験による確認を実施した結果，牛由来たん白質の混入は認められなかった。これらの結果を表 10 に示した。

表 9 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（国内製造牛用飼料等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数			
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			ほ乳動物由来DNA				反すう動物由来DNA		
	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)		試料 点数	検出 点数	検出率 (%)
牛用飼料等													
ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料	4	0	0										0
ほ乳期子牛育成用配合飼料	5	0	0	5	0	0	5	0	0				0
若令牛育成用配合飼料	7	0	0	7	0	0	7	0	0				0
乳用牛飼育用配合飼料	49	0	0	43	0	0	43	0	0				0
幼令肉用牛育成用配合飼料	2	0	0	2	0	0	2	0	0				0
肉用牛肥育用配合飼料	34	0	0	30	0	0	30	0	0				0
乳肉用牛飼育用配合飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
肉牛繁殖用配合飼料	6	0	0	6	0	0	6	0	0				0
牛複数ステージ用飼料	26	0	0	17	0	0	17	0	0				0
糖蜜吸着飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
その他の混合飼料	22	0	0	22	0	0	22	0	0				0
その他の畜種向け飼料 (動物質原料を含むもの)													
混合飼料等	15	0	0	15	0	0				15	0	0	0

表 10 動物由来たん白質のモニタリング等の結果（輸入飼料等）

	顕微鏡鑑定			ELISA試験			PCR試験			総合判定 検出 点数			
	獣骨，獣毛			牛由来たん白質			反すう動物由来DNA						
	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)	試料 点数	検出 点数	検出率 (%)				
牛用混合飼料													
アメリカ合衆国	12	0	0	12	0	0	12	0	0				0
シンガポール	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
スペイン	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
台湾	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
中華人民共和国	4	0	0	4	0	0	4	0	0				0
ブラジル	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
フランス	3	0	0	3	0	0	3	0	0				0
大豆油かす													
台湾	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
海藻ミール													
アイルランド	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
ブラジル	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
乾燥酵母細胞壁													
英国	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
飼料用酵母													
アメリカ合衆国	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0
フランス	1	0	0	1	0	0	1	0	0				0

## 3.3 不溶性不純物

飼料用として出荷，流通している動物性油脂（確認済動物性油脂，回収食用油，混合油脂等）74 点及び特定動物性油脂 1 点について，不溶性不純物の含有量を測定した結果，動物性油脂（食用脂肪に由来する確認済動物性油脂）1 点が不溶性不純物の成分規格を超えるものであった。そのモニタリング等の結果を表 11 に示した。

表 11 不溶性不純物のモニタリング等の結果

モニタリング等の 対象試料	成分規格	試料点数	最大値 (%)	平均値 (%)
動物性油脂 (違反品を除いた場合)	0.15 %以下	74 (73)	0.77 (0.08)	0.08 (0.015)
特定動物性油脂	0.02 %以下	1	0.011	0.011

### 3.4 サルモネラ

国内で製造された単体飼料 63 点及び配混合飼料 56 点について、サルモネラのモニタリング等を実施した。その結果、単体飼料は 63 点のうち 1 点からサルモネラが検出された（検出率 1.6 %（前年度及び前々年度は、共に 1.3 %））。区分別にみると、動物質性飼料 48 点中 1 点で検出（検出率 2.1 %（前年度 1.9 %，前々年度 1.6 %））であり、そうこう類及び植物性油かす類では、前年度及び前々年度と同様にサルモネラは検出されなかった。これらの結果を表 12 に示した。

配混合飼料は 56 点のうち 3 点からサルモネラが検出された（検出率 5.4%（前年度 0 %，前々年度 0.7 %））。これらの結果を表 13 に示した。

サルモネラが検出された 4 点の試料から分離された各血清型を表 14 に示した。これらの血清型のうち、*S. Tennessee* については前年度に国内産魚粉 1 点から分離されており、*S. Typhimurium* 及び *S. Worthington* については過去 5 年以内に飼料から分離された事例はなかった。

なお、病原微生物検出情報<sup>12)</sup>によると、*S. Tennessee* 及び *S. Typhimurium* は国内で発生したサルモネラ食中毒の原因菌としてヒトからも分離されている。特に *S. Typhimurium* については家畜伝染病予防法<sup>13)</sup>における届出伝染病の原因菌とされていることから、飼料の製造・品質管理におけるサルモネラ対策について一層の留意が必要である。

表 12 サルモネラのモニタリング等の結果（単体飼料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試料点数	陽性点数	陽性率 (%)
動物質性飼料			
魚粉	27	1	3.7
チキンミール	9	0	0
フェザーミール	8	0	0
肉骨粉（ポークミール）	2	0	0
原料混合肉骨粉	2	0	0
小 計	48	1	2.1
そうこう類			
ふすま	7	0	0
米ぬか油かす	2	0	0
コーングルテンフィード	1	0	0
麦ぬか	1	0	0
小 計	11	0	0
植物性油かす類			
コーングルテンミール	1	0	0
ごま油かす	1	0	0
大豆油かす	1	0	0
なたね油かす	1	0	0
小 計	4	0	0
合 計	63	1	1.6

表 13 サルモネラのモニタリング等の結果（配混合飼料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試料点数	検出点数	検出率 (%)
牛用配合飼料	21	1	4.8
鶏用配合飼料	15	0	0
豚用配合飼料	13	2	15.4
動物質性たん白質混合飼料	4	0	0
その他の混合飼料	3	0	0
合 計	56	3	5.4

表 14 検出試料から分離されたサルモネラの血清型

血清型	検出された飼料の種類		
	魚粉	牛用配合飼料	豚用配合飼料 (2点中)
<i>S. Tennessee</i>	1		
<i>S. Typhimurium</i>		1	1
<i>S. Worthington</i>			1
合 計	1	1	2

## 文 献

- 1) 法律：飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律，昭和 28 年 4 月 11 日，法律第 35 号 (1953).
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，省令第 35 号 (1976).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) 農林省畜産局長通知：飼料等検査実施要領の制定について，昭和 52 年 5 月 10 日，52 畜 B 第 793 号 (1977).
- 6) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知：飼料中の農薬の検査について，平成 18 年 5 月 26 日，18 消安第 2322 号 (2006).
- 7) 日本油化学会規格試験法委員会編：2.1.1 試料採取方法，基準油脂分析試験法 2013 年版，日本油化学会 (2013) (ISBN: 9784931249066).
- 8) 泉 和夫，石橋 隆幸，青山 幸二，石黒 瑛一：飼料研究報告，27，233 (2002).
- 9) 農林水産省生産局畜産部飼料課課長補佐（検査指導班担当）事務連絡：牛を対象とする飼料の抽出検査の取扱いについて，平成 14 年 11 月 8 日 (2002).
- 10) 農林水産省生産局長通知：反すう動物用飼料への反すう動物等由来たん白質の混入防止に関するガイドラインの制定について，平成 13 年 6 月 1 日，13 生畜第 1366 号 (2001).
- 11) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長：輸入乾牧草の安全性確保について，平成 19 年 5 月 7 日，19 消安第 1297 号 (2007).
- 12) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr.html>，cited 1 July 2017.
- 13) 法律：家畜伝染病予防法，昭和 26 年 5 月 31 日，法律第 166 号 (1951).

## 調査資料

## 2 特定添加物検定結果等について（平成 28 年度）

肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課

## Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2016)

特定添加物とは、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年法律第 35 号．以下「飼料安全法」という．）第 3 条第 1 項の規定に基づき規格が定められた飼料添加物のうち、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律施行令（昭和 51 年政令第 198 号）第 2 条第 2 号に定められた抗菌性物質製剤をいう．特定添加物は、飼料安全法第 5 条第 1 項の規定により、独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という．）が行う検定を受け、検定合格証紙が付されたものでなければ販売してはならないこととされている．ただし、飼料安全法第 7 条第 1 項の登録を受けた特定飼料等製造業者（以下「登録特定飼料等製造業者」という．）が製造し、同法第 16 条第 1 項の表示が付されたもの及び同法第 21 条第 1 項の登録を受けた外国特定飼料等製造業者が製造し、同条第 2 項の表示が付されたものについては、この限りではない．

平成 28 年度に FAMIC に対して検定の申請があり、これに合格した特定添加物について、結果をとりまとめたのでその概要を報告する．また、平成 28 年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等についても併せて報告する．なお、平成 28 年度末の時点で、外国特定飼料等製造業者の登録はない．

## 1 特定添加物の検定申請業者及び品名等

平成 28 年度に検定に合格した特定添加物について、その種類及び品名等を申請業者別に表 1 に示した．

申請は 8 業者からあり（前年度 9 業者）、その製造形態等は、①輸入した製造用原体を用いて製剤の製造のみを行っているのが 4 業者、②製剤の輸入のみを行っているのが 3 業者、③輸入した製造用原体を用いた製剤の製造及び製剤の輸入を行っているのが 1 業者であった．

平成 28 年度に検定に合格した特定添加物は 11 種類、19 銘柄であり（前年度 12 種類、20 銘柄）、製造用原体の製造を海外に依存していた．

製造用原体又は製剤の輸入先国は、①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（製造用原体）、エンラマイシン（製造用原体）、ノシヘプタイド（製造用原体）及び硫酸コリスチン（製造用原体）が中国、②アビラマイシン（製剤）が英国、③クロルテトラサイクリン（製剤）がシンガポール、④ナラシン（製剤）及びリン酸タイロシン（製剤）が米国、⑤フラボフォスフォルポール（製剤）がブルガリア、⑥サリノマイシンナトリウム（製造用原体）及びモネンシンナトリウム（製造用原体）が中国及びブルガリア、⑦硫酸コリスチン（製剤）が韓国で、6 カ国（前年度 6 カ国）であった．

表 1 検定申請業者及び品名等一覧  
(平成 28 年度)

管 区 <sup>※1</sup>	申 請 業 者 名	製造事業場名	特 定 添 加 物 の 種 類	飼料級 に該当	申 請 品 名	含有力価 (mg(力価)/g)	備 考
本 部	株式会社ティエヌビー <sup>※2</sup>	—	クロルテトラサイクリン	○	CTC F-100	100	
	ニッチク薬品工業株式会社	相模工場	サリノマイシンナトリウム	○	サリノマイシンTZ100	100	
			モネンシンナトリウム		モネンシンTZ20	200	
	日本ニュートリション株式会社	鹿島工場	サリノマイシンナトリウム	○	サックス100	100	
	ミヤリサン製薬株式会社 <sup>※2</sup>	—	フラボフォスフォリボール	○	フラボマイシン80	80	
	ロック化学製品株式会社	御殿場工場	エンラマイシン	○	エンラマイシン8%R	80	
			サリノマイシンナトリウム	○	サリノ10%R-K	100	
硫酸コリスチン				硫酸コリスチン10%R	100		
		硫酸コリスチン		硫酸コリスチン10%RI	100		
神 戸	株式会社科学飼料研究所	龍野工場	硫酸コリスチン		コリスチン10%G「明治」	100	
	日本イーライリリー株式会社 <sup>※2</sup>	—	アピラマイシン	○	サーマックス200	200	
			ナラシン	○	モンデパン100	100	
			リン酸タイロシン		タイロシン275	275	
福 岡	株式会社科学飼料研究所	日向工場	硫酸コリスチン		硫酸コリスチン「科研」10%G	100	
	コーキン化学株式会社	九州工場	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		デーエム-400FA	400	
			サリノマイシンナトリウム	○	コクシスタック-100FA	100	
			ノシヘプタイド		ノシヘプタイド40	40	
			モネンシンナトリウム		モネンシン200K	200	
日本ニュートリション株式会社 <sup>※2</sup>	—	硫酸コリスチン		硫酸コリスチン10%	100		
計	8業者	10事業場	11種類		19銘柄		

※1 本部管区: 関東・甲信越・静岡, 神戸管区: 近畿・中国(山口除く)・四国, 福岡管区: 山口・九州・沖縄

※2 輸入業者に該当

## 2 特定添加物の種類別の検定合格件数等

平成 28 年度の特定添加物の種類別の検定合格件数, 合格数量及び実量力価換算量を平成 26 年度及び平成 27 年度の結果とともに表 2 に示した。

平成 28 年度の検定合格件数は 192 件, 合格数量は 871 トンで実量力価換算量は 93 トン(力価)であった。件数, 数量及び実量力価換算量の対前年度比は, それぞれ 106.1 %, 110.7 %, 105.2 %となり, 件数, 数量及び実量力価換算量ともに増加した。

平成 28 年度の検定合格数量を種類別にみると, サリノマイシンナトリウムが全体の 33.3 % (前年度 36.7 %) で最も多く, 次いで硫酸コリスチン 24.4 % (前年度 28.5 %), ナラシン 22.7 % (前年度 16.7 %), アピラマイシン 8.4 % (前年度 8.0 %), ノシヘプタイド 6.9 % (前年度 2.8 %) となった。また, 実量力価換算量では, サリノマイシンナトリウムが全体の 31.1 % (前年度 32.6 %) で最も多く, 次いで硫酸コリスチン 22.8 % (前年度 25.3 %), ナラシン 21.2 % (前年度 14.9 %), アピラマイシン 15.7 % (前年度 14.2 %), ノシヘプタイド 2.6 % (前年度 1.0 %) となった。

平成 28 年度の検定合格数量及び実量力価換算量を前年度と比較すると, エンラマイシン, ノシヘプタイド, サリノマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム, 及びアピラマイシンは増加し, 一方, 硫酸コリスチン, 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及びリン酸タイロシンは減少した。また, 前年度検定の実績があった亜鉛バシトラシンは申請がなかった。

ラサロシドナトリウムは平成 22 年度から, バージニアマイシンは平成 20 年度から, センデュラマイシンナトリウムは平成 19 年度から, エフロトマイシンは平成 17 年度から, ビコザマイシンは平成 11 年度から検定の申請がなく, これらは平成 28 年度も申請がなかった。なお, ラサロシドナトリウムは, 後述の表 5 に示したとおり, 登録特定飼料等製造業者による製造実績があった。

表 2 検定合格件数，合格数量及び実量力価換算量（種類別）  
（平成 26 年度～平成 28 年度）

類 別	特定添加物の種類	平成26年度					平成27年度					平成28年度				
		合格件数 (件)	合格数量 (kg)	構成比 (%)	実量力価 換算量 (kg(力価))	構成比 (%)	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	構成比 (%)	実量力価 換算量 (kg(力価))	構成比 (%)	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	構成比 (%)	実量力価 換算量 (kg(力価))	構成比 (%)
ポリペプ タイド系	亜鉛パントラシン	7	34,780	3.8	3,727	3.6	2	9,500	1.2	950	1.1	—	—	—	—	—
	エンゾマイシン	2	2,380	0.3	190	0.2	3	3,720	0.5	298	0.3	2	4,820	0.6	386	0.4
	ノシヘプタイド	3	12,000	1.3	480	0.5	6	22,000	2.8	880	1.0	15	60,000	6.9	2,400	2.6
	硫酸コリスチン	41	158,120	17.4	15,812	15.1	58	223,820	28.5	22,382	25.3	55	212,680	24.4	21,268	22.8
	小 計	53	207,280	22.8	20,209	19.3	69	259,040	32.9	24,510	27.7	72	277,500	31.9	24,054	25.8
テトラサイ クリン系	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	1	2,000	0.2	800	0.8	1	3,000	0.4	1,200	1.4	1	1,400	0.2	560	0.6
	クロルテトラサイクリン	3	14,400	1.6	1,440	1.4	3	14,000	1.8	1,400	1.6	3	14,000	1.6	1,400	1.5
	小 計	4	16,400	1.8	2,240	2.1	4	17,000	2.2	2,600	2.9	4	15,400	1.8	1,960	2.1
マクロライド 系	リン酸タイロシン	5	19,370	2.1	5,327	5.1	4	19,994	2.5	5,498	6.2	1	5,039	0.6	1,386	1.5
	小 計	5	19,370	2.1	5,327	5.1	4	19,994	2.5	5,498	6.2	1	5,039	0.6	1,386	1.5
ポリサッカ ライド系	フラボフォスフォルボール	—	—	—	—	—	1	1,250	0.2	100	0.1	1	1,250	0.1	100	0.1
	小 計	—	—	—	—	—	1	1,250	0.2	100	0.1	1	1,250	0.1	100	0.1
ポリエーテ ル系	サリノマイシンナトリウム	61	244,875	26.9	24,488	23.4	71	288,780	36.7	28,878	32.6	72	289,487	33.3	28,949	31.1
	センドュラマイシンナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ナラシン	29	317,775	34.9	31,778	30.3	12	131,625	16.7	13,163	14.9	18	197,500	22.7	19,750	21.2
	モネンシンナトリウム	3	12,140	1.3	2,428	2.3	3	6,080	0.8	1,216	1.4	4	11,500	1.3	2,300	2.5
	ラサロシドナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
小 計	93	574,790	63.2	58,693	56.0	86	426,485	54.2	43,257	48.9	94	498,487	57.3	50,999	54.8	
その他	アピラマイシン	25	91,575	10.1	18,315	17.5	17	62,675	8.0	12,535	14.2	20	72,950	8.4	14,590	15.7
	エフロマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	バージニアマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ピコザマイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
小 計	25	91,575	10.1	18,315	17.5	17	62,675	8.0	12,535	14.2	20	72,950	8.4	14,590	15.7	
総 計	180	909,415	100.0	104,784	100.0	181	786,444	100.0	88,499	100.0	192	870,626	100.0	93,088	100.0	
対前年度比 (%)	91.4	98.6	97.3	100.6	86.5	84.5	106.1	110.7	105.2							

—：実績なし

### 3 特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数等

特定添加物は、培養後の製造方法の違いにより、精製級と飼料級に区分される。前者は、抗生物質の有効成分のみを培養液から抽出及び精製した高純度の製造用原体に由来するもので、後者は、抗生物質の有効成分、製造に用いた培地成分及び菌体成分を含む培養液を乾燥した製造用原体に由来するものである。

平成 28 年度の特定添加物の精製級及び飼料級別の検定合格件数，合格数量及び実量力価換算量を表 3 に示した。

精製級と飼料級の割合を比較すると、飼料級が検定合格件数全体の 60.4 %（前年度 61.3 %），検定合格数量全体の 66.6 %（前年度 65.8 %），実量力価換算量全体の 70.0 %（前年度 65.0 %）を占めた。

ノシヘプタイド，硫酸コリスチン及びサリノマイシンナトリウムは、精製級と飼料級の両規格が設定されているが、平成 28 年度は、ノシヘプタイド及び硫酸コリスチンは精製級のみ、サリノマイシンナトリウムは飼料級のみ検定の実績があった。

表3 検定合格件数、合格数量及び実量力価換算量（精製級・飼料級別）  
（平成28年度）

類 別	特 定 添 加 物 の 種 類	精 製 級 <sup>※</sup>			飼 料 級 <sup>※</sup>		
		合格 件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	合格 件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))
ポリペプチド系	亜鉛バシトリン	/	/	/	—	—	—
	エンラマイシン	/	/	/	2	4,820	386
	バシヘプチド	15	60,000	2,400	—	—	—
	硫酸コリスチン	55	212,680	21,268	—	—	—
テトラサイクリン系	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	1	1,400	560	/	/	/
	クロルテトラサイクリン	/	/	/	3	14,000	1,400
マクロライド系	リン酸タイロシン	1	5,039	1,386	/	/	/
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリポール	/	/	/	1	1,250	100
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	—	—	—	72	289,487	28,949
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	/	/	/
	ナラシン	/	/	/	18	197,500	19,750
	モネンシンナトリウム	4	11,500	2,300	/	/	/
	ラサロシドナトリウム	—	—	—	/	/	/
その他	アピラマイシン	/	/	/	20	72,950	14,590
	エフロマイシン	—	—	—	/	/	/
	バージニアマイシン	—	—	—	/	/	/
	ピコザマイシン	—	—	—	/	/	/
合 計		76	290,619	27,914	116	580,007	65,174
割 合 (%)		39.6	33.4	30.0	60.4	66.6	70.0

—:実績なし

※ 斜線は、当該区分の規格がないことを示す。

#### 4 特定添加物の類別の検定合格数量等の推移

平成19年度から平成28年度までの過去10年間における特定添加物の類別の検定合格数量及び実量力価換算量の推移をそれぞれ図1及び図2に示した。

検定合格数量全体では、平成21年度に一部銘柄において登録特定飼料等製造業者による製造へ移行した影響で大幅な減少が見られたが、それ以降はほぼ横ばいで推移している。また、実量力価換算量についても同様の傾向であった。

特定添加物の検定合格数量を類別にみると、いずれの年度もポリエーテル系が最も多く、平成22年度に50%を切ったものの、その他の年度は全体の50%以上を占める割合で推移している。平成28年度は、ポリエーテル系が全体の57%（前年度54%）、次いでポリペプチド系が32%（前年度33%）を占めた。

また、実量力価換算量でも同様にポリエーテル系が最も多く、平成19年度から平成20年度は全体の60%前後で推移し、平成21年度以降も50%前後を維持している。平成28年度は、ポリエーテル系が55%（前年度49%）、次いでポリペプチド系が26%（前年度28%）を占めた。

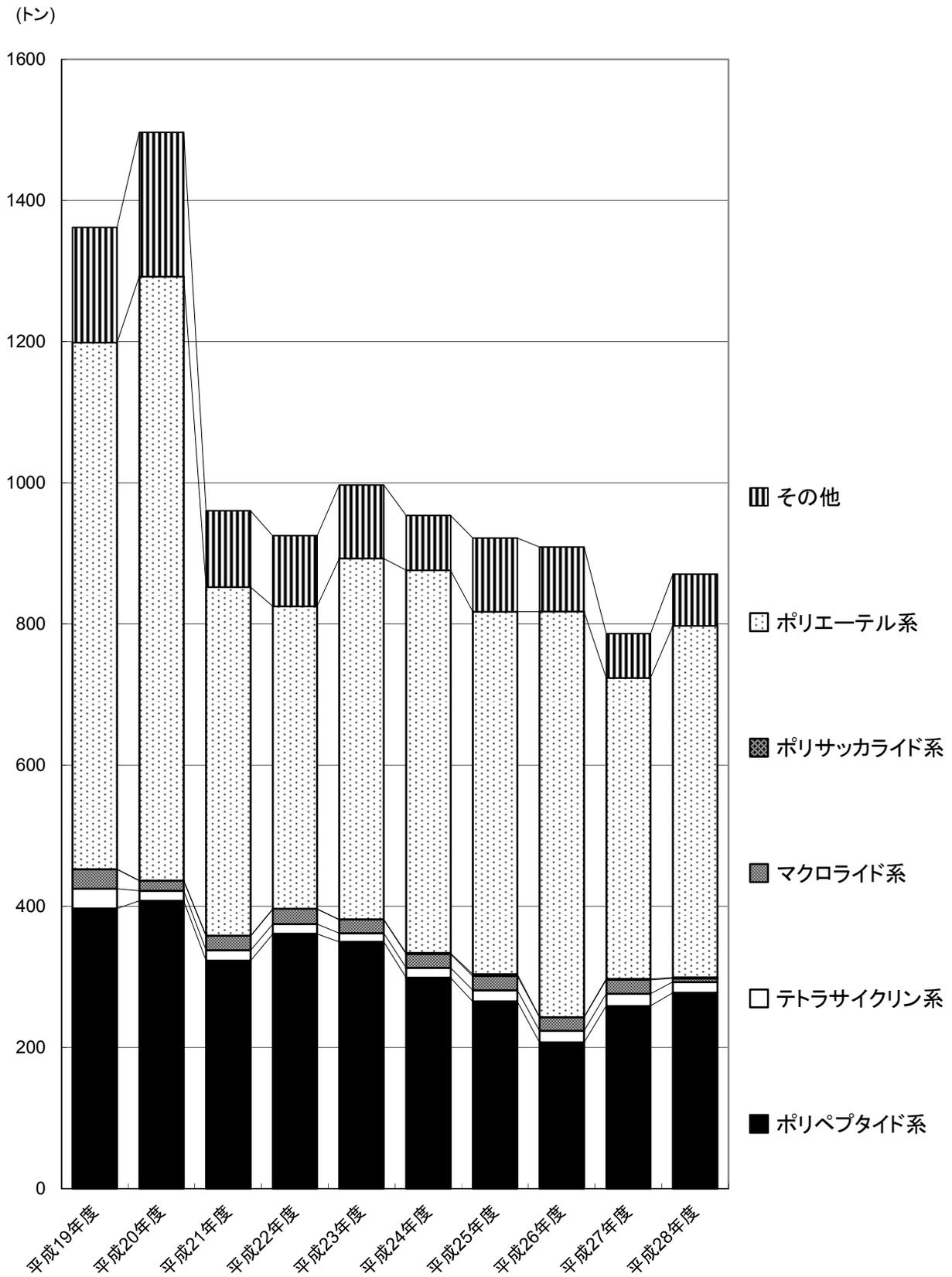


図 1 特定添加物の検定合格数量の推移（類別）

(トン(カ価))

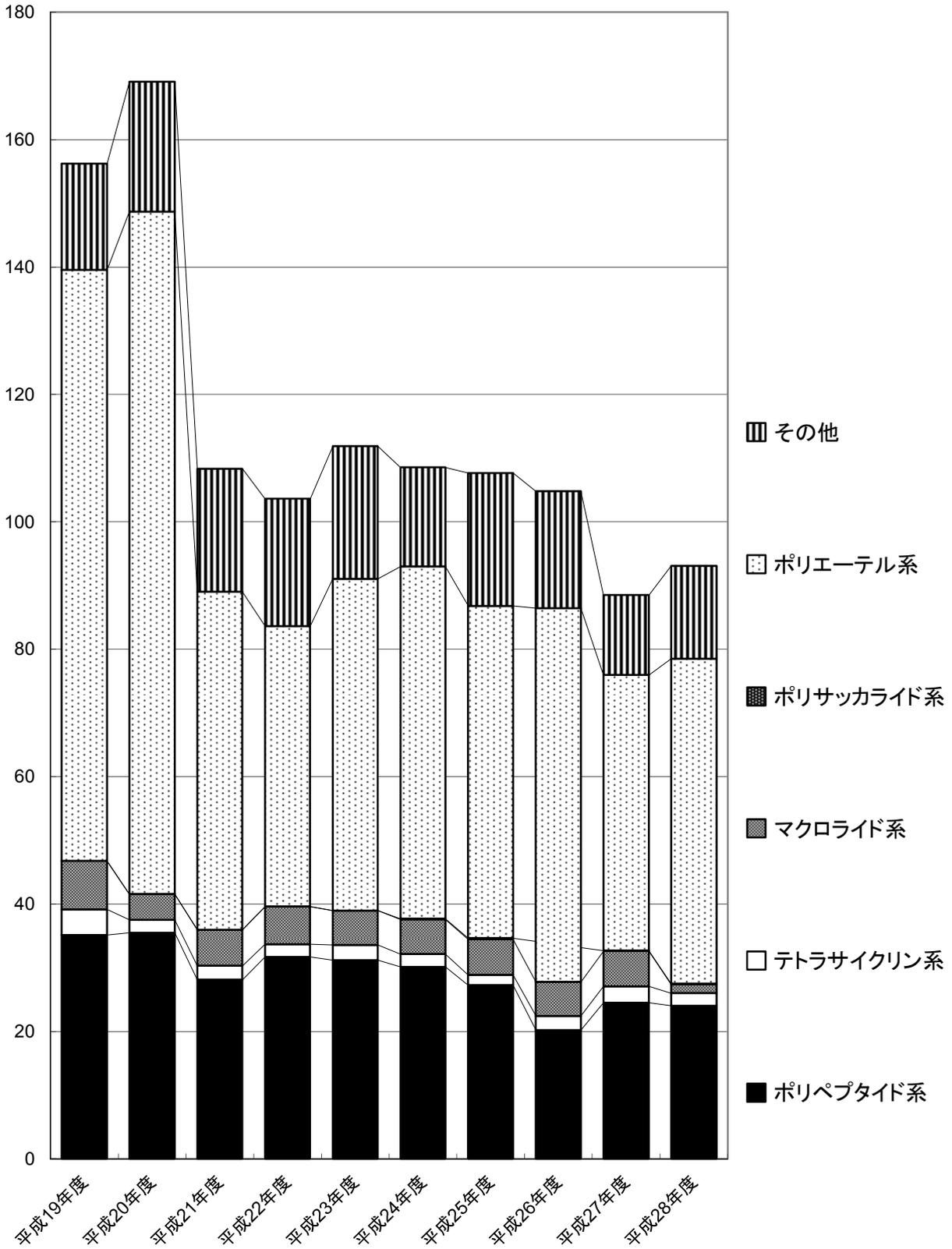


図2 特定添加物の検定合格の実量カ価換算量の推移(類別)

5 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等

平成 28 年度末の時点で、株式会社科学飼料研究所龍野工場がエンラマイシン、サリノマイシンナトリウム、ノシヘプタイド、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム及び硫酸コリスチン、コーキン化学株式会社九州工場第三工場がノシヘプタイドに係る登録特定飼料等製造業者の事業場として登録されている。

平成 28 年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量及び実量力価換算量を表 4 に示した。なお、ラサロシドナトリウムは、表 2 で示したとおり検定実績はなかったが、登録特定飼料等製造業者による製造実績があった。

平成 28 年度の登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量は 843 トン（対前年度比 119%）、実量力価換算量は 117 トン(力価)（対前年度比 113%）であった。

平成 28 年度の製造数量は、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、エンラマイシン、ノシヘプタイド、硫酸コリスチンの順に多かった。また、実量力価換算量は、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、エンラマイシン、ノシヘプタイド、硫酸コリスチンの順に多かった。

表 4 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量等  
（平成 27・28 年度）

類 別	特定添加物の種類	平成27年度		平成28年度	
		製造数量※ (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))	製造数量※ (kg)	実量力価 換算量 (kg(力価))
ポリペプチド系	エンラマイシン	34,620	2,770	76,680	6,134
	ノシヘプタイド	48,220	1,929	27,720	1,109
	硫酸コリスチン	4,000	400	8,120	812
	小 計	86,840	5,098	112,520	8,055
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	201,200	20,120	314,240	31,424
	モネンシンナトリウム	303,760	60,752	299,560	59,912
	ラサロシドナトリウム	116,920	17,538	117,060	17,559
	小 計	621,880	98,410	730,860	108,895
総 計		708,720	103,508	843,380	116,950
対前年度比 (%)		103	113	119	113

※ 各登録特定飼料等製造業者より聞き取り

6 特定添加物の総数量等

平成 28 年度の特定添加物の検定合格数量（製造及び輸入）と登録特定飼料等製造業者による製造数量の総計（以下「総数量」という。）及びその実量力価換算量を表 5 に示した。

平成 28 年度の特定添加物の総数量を類別にみると、ポリエーテル系が最も多く、1,229 トン（検定：498 トン、登録：731 トン）と全体の 71.7 %を占め、種類別ではサリノマイシンナトリウム（35.2 %）、モネンシンナトリウム（18.1 %）、硫酸コリスチン（12.9 %）の順に多かった。また、実量力価換算量を類別にみると、同様にポリエーテル系が 160 トン（力価）（検定：51 トン（力価）、登録：109 トン（力価））と全体の 76.1 %を占め最も多く、種類別ではモネンシンナトリウム（29.6 %）、サリノマイシンナトリウム（28.7 %）、硫酸コリスチン（10.5 %）の順に多かった。

次に、平成 19 年度から平成 28 年度までの過去 10 年間における特定添加物の総数量及び実量力価換算量の類別の推移をそれぞれ図 3 及び図 4 に示した。

登録特定飼料等製造業者による製造は平成 19 年度から開始されており、平成 21 年度には、登録銘柄の大幅な追加があった影響で、登録特定飼料等製造業者による製造の割合が増加した。

特定添加物の総数量及び実量力価換算量ともに、平成 22 年度に増加した後はほぼ横ばいで推移していたが、平成 28 年度は増加した。

平成 28 年度は、特定添加物の総数量全体の 49 % (前年度 47 %)，実量力価換算量全体の 56 % (前年度 54 %) を登録特定飼料等製造業者による製造が占めた。

表 5 特定添加物の総数量等  
(平成 28 年度)

類別	特定添加物の種類	総数量※ <sup>1</sup>		実量力価換算量※ <sup>2</sup>	
		(kg)	構成比 (%)	(kg(力価))	構成比 (%)
ポリペプチド系	亜鉛バシトリン	—	—	—	—
	エンラマイシン	81,500	4.8	6,520	3.1
	ノシヘプチド	87,720	5.1	3,509	1.7
	硫酸コリスチン	220,800	12.9	22,080	10.5
	小計	390,020	22.8	32,109	15.3
テトラサイクリン系	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	1,400	0.1	560	0.3
	クロルテトラサイクリン	14,000	0.8	1,400	0.7
	小計	15,400	0.9	1,960	0.9
マクロライド系	リン酸タイロシン	5,039	0.3	1,385	0.7
	小計	5,039	0.3	1,385	0.7
ポリサッカライド系	フラボフォスフォリポール	1,250	0.1	100	0.0
	小計	1,250	0.1	100	0.0
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	603,727	35.2	60,373	28.7
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—
	ナラシン	197,500	11.5	19,750	9.4
	モネンシンナトリウム	311,060	18.1	62,212	29.6
	ラサロシドナトリウム	117,060	6.8	17,559	8.4
	小計	1,229,347	71.7	159,894	76.1
その他	アビラマイシン	72,950	4.3	14,590	6.9
	エフロトマイシン	—	—	—	—
	バージニアマイシン	—	—	—	—
	ピコザマイシン	—	—	—	—
	小計	72,950	4.3	14,590	6.9
総計	1,714,006	100.0	210,038	100.0	

—:実績なし

※1 検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造数量の総計

※2 検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造の実量力価換算量の総計

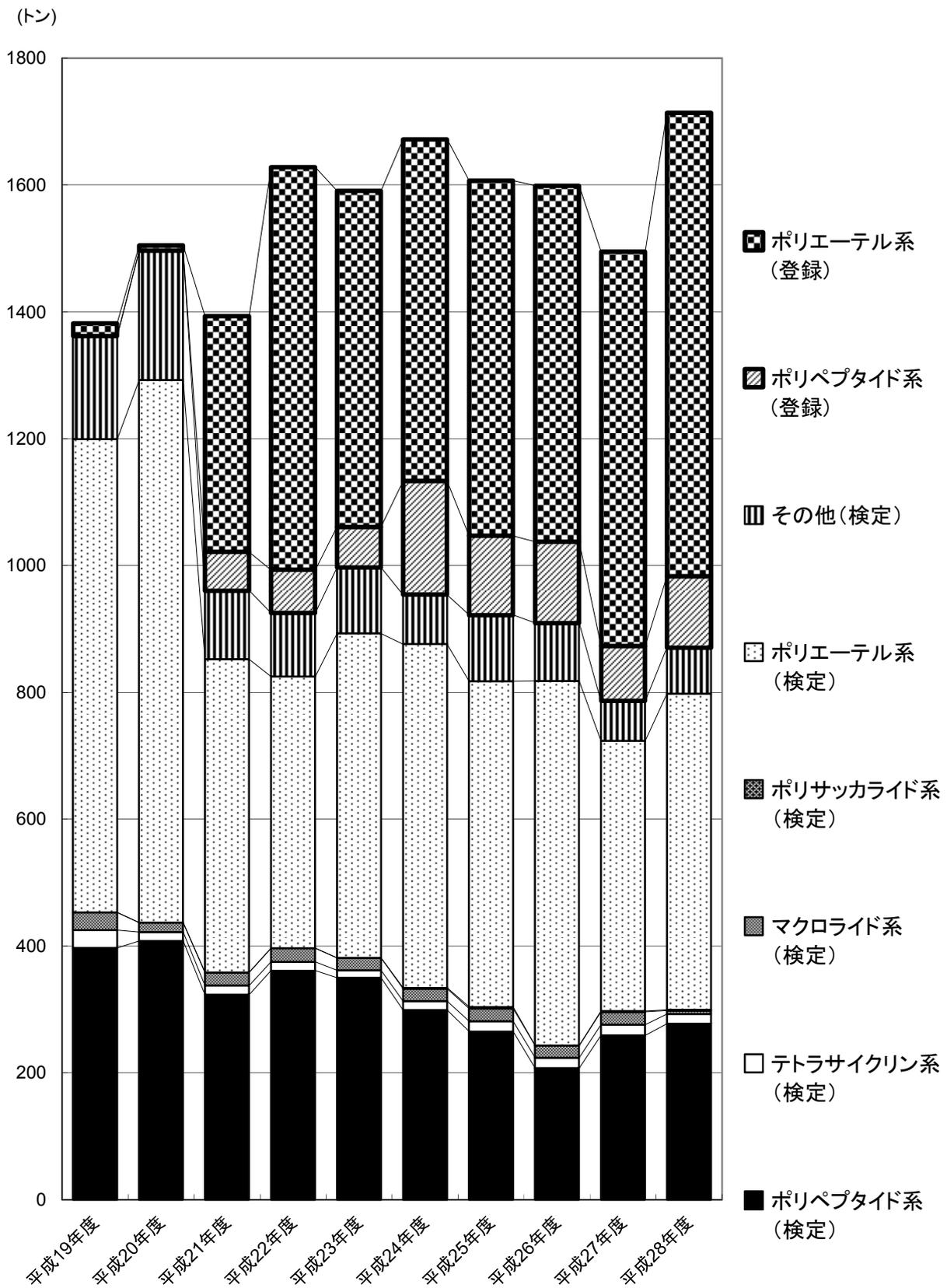


図 3 特定添加物の総数量の推移（類別）

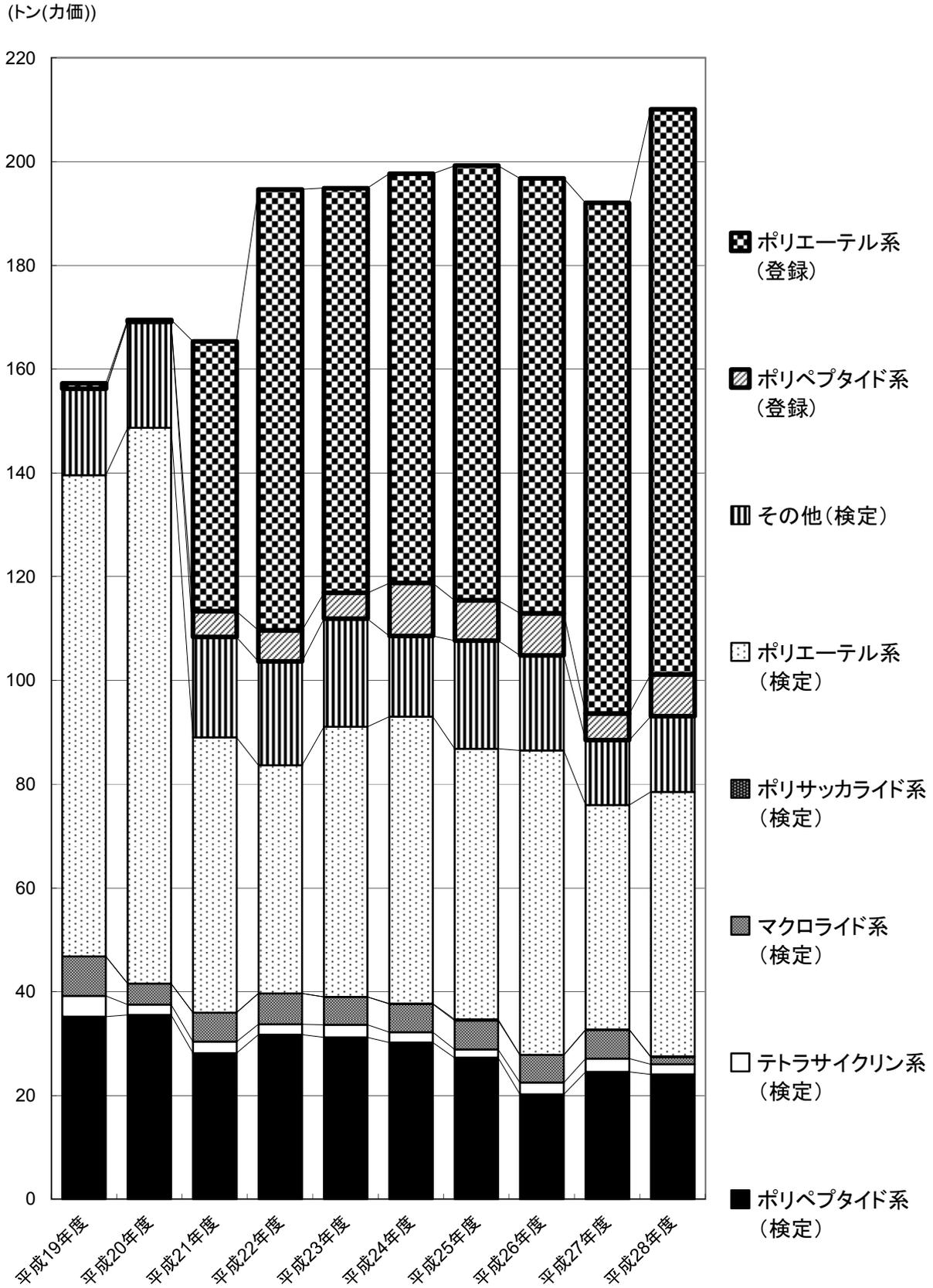


図4 特定添加物の総数の実量カ価換算量の推移(類別)

## 7 要 約

平成 28 年度の特定添加物の検定及び登録特定飼料等製造業者による製造の結果は、以下のとおりである。

- 1) 検定に合格した特定添加物は、8 業者から申請された、11 種類、19 銘柄であった。
- 2) 特定添加物の検定合格件数は 192 件、合格数量は 871 トン、実量力価換算量は 93 トン(力価)で、前年度に比べて、件数、数量及び実量力価換算量ともに増加した。
- 3) 特定添加物の検定合格数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、硫酸コリスチン、ナラシンの順に多かった。また、実量力価換算量についても、サリノマイシンナトリウム、硫酸コリスチン、ナラシンの順に多かった。
- 4) 特定添加物の検定合格数量について、精製級と飼料級の割合を比較すると、飼料級が全体の 67%を占めた。また、実量力価換算量では、飼料級が 70%を占めた。
- 5) 登録特定飼料等製造業者による特定添加物の製造数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウムの順に多かった。また、実量力価換算量については、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、ラサロシドナトリウムの順に多かった。
- 6) 特定添加物の検定合格数量と登録特定飼料等製造業者による製造数量とを合計した総数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム、モネンシンナトリウム、硫酸コリスチンの順に多かった。また、実量力価換算量では、モネンシンナトリウム、サリノマイシンナトリウム、硫酸コリスチンの順に多かった。



他誌掲載論文

(抄録)

1 Development and inter-laboratory study of a method for quantifying zearalenone in pet foods

M. Nomura, T. Wada, T. Ishibashi, T. Komoriya, T. Nagahara, T. Chihara  
World Mycotoxin Journal, 9 (4), 497-503 (2016).



## 飼料研究報告編集委員

委員長	山本 実	副委員長	荻野 喜江
	青山 幸二		原 秀樹
	石橋 隆幸		日比野 洋
	関口 好浩		渕上 佐知子
	高橋 亜紀子		松崎 学
	橋本 亮		山多 利秋

## 飼料研究報告 第42号

発行 独立行政法人農林水産消費安全技術センター  
埼玉県さいたま市中央区新都心2番地1  
さいたま新都心合同庁舎検査棟  
TEL 050-3797-1857  
FAX 048-601-1179  
<http://www.famic.go.jp/>

平成29年9月

編集 飼料研究報告編集委員会