

飼料研究報告

第48号

令和5年

Research Report of Animal Feed

Vol. 48
2023



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)

WOAH 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、農林水産行政と密接に連携しつつ、農業生産資材（肥料、農薬、飼料及び飼料添加物並びに土壌改良資材）や食品を対象として科学的な検査・分析を行い、農業生産資材の安全の確保、食品等の品質の改善・表示の適正化等に取り組んでいます。

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い、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。さらに、FAMIC の飼料部門は、国際獣疫事務局（WOAH）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）に記載されています。

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、関係各位におかれては、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。

令和 5 年 9 月

理事長 木内 岳志

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。

令和4年度飼料分析基準検討会委員
(敬称略。五十音順。役職は令和5年3月現在。)

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 畜産研究部門 研究推進部 研究推進室
久城 真代	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 食品流通・安全研究領域 食品安全・信頼グループ 主席研究員
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
坂 真智子	株式会社エスコ 代表取締役社長
永山 敏廣	明治薬科大学 特任教授
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 名誉教授
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 食品研究部門 アドバイザー

目 次

1 稲わら及び稲発酵粗飼料中のベンズルフロロンメチル及びその他の農薬6成分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分析法の開発 船木 紀夫, 小堀 拓也, 関口 好浩 ……………	1
2 稲わら及び稲発酵粗飼料中のベンフラカルブ及びカルボスルファン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分析法の開発 齊木 雅一, 平田 絵理香, 近藤 勝, 船水 悦子 ……………	15
3 飼料中のジクワット及びパラコート of 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の開発 伊澤 淳修, 加藤 耕一, 桑原 正良, 塩津 萌々子, 山上 陽平, 保田 伊世 ……………	26
4 豚用配合飼料中のシスチン, リジン, メチオニン及びトレオニンのアミノ酸自動分析装置による分析法の検討 土井 雄悟, 山上 陽平 ……………	40
5 とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル中のアフラトキシン, ステリグマトシスチン及びゼアラレノンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の検討 渡辺 ちとせ, 林 菜月 ……………	50
6 乾牧草及び稲わら中のカドミウムの原子吸光光度計による定量法への湿式分解追加に係る妥当性確認 元木 太郎, 板橋 葵, 門屋 日菜 ……………	65

精度管理

1 令和4年度飼料等の共通試料による分析鑑定について 土井 雄悟, 船水 悦子, 井上 華歩, 小堀 拓也, 佐藤 琢実, 酒井 妙衣 ……………	71
---------------------------------------------------------------------------------	----

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 (令和4年度) 肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課, 飼料鑑定第二課 ……	98
2 特定添加物検定結果等について (令和4年度) 肥飼料安全検査部 飼料鑑定第二課 ……………	118

他誌掲載論文 (抄録)

- 1 Extraction efficiency of kojic acid from ammonia-treated or non-treated agar medium with various methanol aqueous solvents
HAYASHI Natsuki, AOYAMA Koji, KISHIMOTO Marin,
MORIMITSU Yasujiro, FURUKAWA Tomohiro and
KUSHIRO Masayo
(JSM Mycotoxins, 72(2), 85-87 (2022).) 129

- 2 Whole agar dish culture extraction method to assess the survival of aflatoxigenic fungi in soil samples
KISHIMOTO Marin, FURUKAWA Tomohiro,
HAYASHI Natsuki, KARASAWA Toshihiko,
MORIMITSU Yasujiro, YABE Kimiko and KUSHIRO Masayo
(JSM Mycotoxins, 73(1), 1-5 (2023).) 129

- 3 Inter-laboratory study on simultaneous quantification of ten trichothecenes in feed
NOMURA Masayo, SHIDARA Kenji and YASUDA Iyo
(Mycotoxin Research, 39 (2), 95-108 (2023).) 129

CONTENTS

1	Development of Simultaneous Determination Method of Bensulfuron-Methyl and Other 6 Pesticide Ingredients in Rice Straw and Whole-Crop Rice Silage by LC-MS/MS FUNAKI Norio, KOBORI Takuya and SEKIGUCHI Yoshihiro	1
2	Development of Simultaneous Determination Method of Benfuracarb and Carbosulfan in Rice Straw and Whole-Crop Rice Silage by LC-MS/MS SAIKI Masakazu, HIRATA Erika, KONDO Masaru and FUNAMIZU Etsuko	15
3	Development of Simultaneous Determination Method of Diquat and Paraquat in Feed by LC-MS/MS IZAWA Atsunobu, KATO Koichi, KUWABARA Masayoshi, SHIOTSU Momoko, YAMAGAMI Yohei and YASUDA Iyo	26
4	Study of Determination Method of Cystine, Lysine, Methionine and Threonine in Formula Feed for Pigs by Automatic Amino Acid Analyzer DOI yugo and YAMAGAMI yohei	40
5	Study of Determination Method of Aflatoxin, Sterigmatocystin and Zearalenone in Corn Dried Distillers Grains with Solubles by LC-MS/MS WATANABE Chitose and HAYASHI Natsuki	50
6	Validation Study for Addition of Wet Decomposition to Determination Method of Cadmium in Grass Hay and Rice Straw by Atomic Absorption Spectrometer MOTOKI Taro, ITABASHI Aoi and KADOYA Hina	65
§ Proficiency test		
1	Proficiency Test (in the Fiscal Year 2022) DOI Yugo, FUNAMIZU Etsuko, INOUE Kaho, KOBORI Takuya, SATO Takumi and SAKAI Tae	71
§ Investigative report		
1	Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2022) Feed Analysis 1st Division and 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	98

2	Results of Official Testing of Specified Feed Additives (in the Fiscal Year 2022)		
		Feed Analysis 2nd Division, Fertilizer and Feed Inspection Department	118
§ Papers accepted in other journals (abstract)			
1	Extraction efficiency of kojic acid from ammonia-treated or non-treated agar medium with various methanol aqueous solvents		
		HAYASHI Natsuki, AOYAMA Koji, KISHIMOTO Marin, MORIMITSU Yasujiro, FURUKAWA Tomohiro and KUSHIRO Masayo (JSM Mycotoxins, 72(2), 85-87 (2022).)	129
2	Whole agar dish culture extraction method to assess the survival of aflatoxigenic fungi in soil samples		
		KISHIMOTO Marin, FURUKAWA Tomohiro, HAYASHI Natsuki, KARASAWA Toshihiko, MORIMITSU Yasujiro, YABE Kimiko and KUSHIRO Masayo (JSM Mycotoxins, 73(1), 1-5 (2023).)	129
3	Inter-laboratory study on simultaneous quantification of ten trichothecenes in feed		
		NOMURA Masayo, SHIDARA Kenji and YASUDA Iyo (Mycotoxin Research, 39 (2), 95-108 (2023).)	129

1 稲わら及び稲発酵粗飼料中のベンスルフロンメチル及びその他の農薬6成分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分析法の開発

船木 紀夫*, 小堀 拓也*, 関口 好浩*

Development of Simultaneous Determination Method of Bensulfuron-Methyl and Other 6 Pesticide Ingredients in Rice Straw and Whole-Crop Rice Silage by LC-MS/MS

FUNAKI Norio*, KOBORI Takuya* and SEKIGUCHI Yoshihiro*

(* Nagoya Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

We have developed a simultaneous quantitative determination method of the concentration of azimsulfuron, bensulfuron-methyl, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron in rice straw and whole-crop rice silage (WCRS) using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Having added water to a sample, azimsulfuron, bensulfuron-methyl, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron were extracted with acetone, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then diluted with acetone. The diluted solution was purified with two types of solid phase extraction columns (InertSep K-solute, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan and ENVI-Carb, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA), and injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of seven pesticides. LC separation was then carried out on an ODS column (Mightysil RP-18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm, Kanto Chemical Co., Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and methanol as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on rice straw and WCRS. Seven pesticide ingredients were added at the levels of 0.04 and 0.5 mg/kg for rice straw and 0.02 and 0.2 mg/kg for WCRS respectively. The resulting mean recoveries ranged as following: 84.1 % to 96.0 % for azimsulfuron; 91.7 % to 120 % for bensulfuron-methyl; 89.7 % to 118 % for cyclosulfamuron; 70.7 % to 90.0 % for ethoxysulfuron; 72.6 % to 85.7 % for flucetosulfuron; 71.4 % to 82.8 % for halosulfuron-methyl; and 75.2 % to 82.5 % for imazosulfuron. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was as following: less than 8.4 % for azimsulfuron; less than 3.2 % for bensulfuron-methyl; less than 3.4 % for cyclosulfamuron; less than 4.7 % for ethoxysulfuron; less than 6.4 % for flucetosulfuron; less than 8.9 % for halosulfuron-methyl; and less than 15 % for imazosulfuron.

Key words: azimsulfuron; bensulfuron-methyl; cyclosulfamuron; ethoxysulfuron; flucetosulfuron; halosulfuron-methyl; imazosulfuron; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice straw; whole-crop rice silage

キーワード：アジムスルフロン；ベンスルフロンメチル；シクロスルフアムロン；エトキシスルフロン；フルセトスルフロン；ハロスルフロンメチル；イマゾスルフロン；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；稲わら；稲発酵粗飼料

* 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

1 緒 言

ベンスルフロンメチルは DuPont de Nemours (米国) により開発されたスルホニルウレア系除草剤であり、ノビエを除く主要な水田雑草に卓効を示す¹⁾。我が国では 1987 年に農薬登録されており、飼料の有害物質の管理基準値²⁾として、稲わらで 0.1 mg/kg、稲発酵粗飼料 (以下「WCRS」という。) で 0.05 mg/kg と設定されているが、その分析法は飼料分析基準³⁾に記載されていない。

令和 3 年度に武田ら⁴⁾は、一般財団法人日本食品分析センターが平成 25 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。) を用いたアジムスルフロン、ベンスルフロンメチル、シクロスルフアムロン、エトキシスルフロン及びイマゾスルフロンの同時定量法⁵⁾ (以下「JFRL 法」という。) を基に、飼料用稲 (稲わら、WCRS 及び粃米) 中のベンスルフロンメチルを対象として飼料分析基準への収載の可否を検討し、稲わら、WCRS 及び粃米のいずれにも適用可能な定量法 (以下「LC-MS/MS 法」という。) であることを報告した。

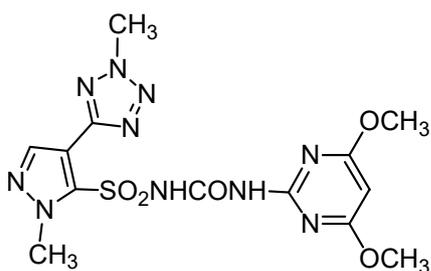
その際、ベンスルフロンメチルと同じスルホニアウレア系除草剤であるアジムスルフロン、シクロスルフアムロン、エトキシスルフロン、フルセトスルフロン及びイマゾスルフロンについても、JFRL 法を適用できる可能性を考慮し、同時定量法としての適用を併行して検討した。なお、フルセトスルフロンについては、平成 27 年に一般財団法人日本食品分析センターにより JFRL 法への適用の妥当性が確認されている⁶⁾。さらに、管理基準値として稲わらで 0.2 mg/kg、WCRS で 0.8 mg/kg と設定されており、平成 21 年に JFRL 法とは異なる方法⁷⁾が開発されているハロスルフロンメチルについても、上述の農薬と同じスルホニルウレア系除草剤であることから、同時定量法としての適用を検討した。

その結果、シクロスルフアムロン、エトキシスルフロン及びフルセトスルフロンについては、ベンスルフロンメチルとの同時定量法として適用可能であることが確認された。アジムスルフロン、ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンについては、稲わら及び WCRS においてマトリックス効果によるイオン化抑制のため、回収率が飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン (以下「妥当性確認法ガイドライン」という。) に定められた真度の目標値を満たさなかった。

そこで今回、アジムスルフロン、ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンを追加するため、稲わら及び WCRS を用いて、LC-MS/MS 法の改良を検討するとともに、7 成分同時定量法の飼料分析基準への収載の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考に各農薬の構造式等を Fig. 1 に示した。

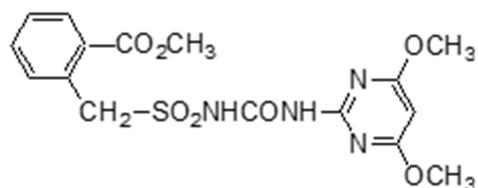
Azimsulfuron



1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-[1-methyl-4-(2-methyl-2H-tetrazol-5-yl)pyrazol-5-ylsulfonyl]urea

C₁₃H₁₆N₁₀O₅S MW: 424.40 CAS No.: 120162-55-2

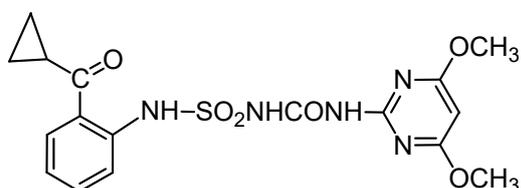
Bensulfuron-methyl



Methyl α -(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)carbamoylsulfamoyl)-o-toluate

C₁₆H₁₈N₄O₇S MW: 410.40 CAS No.: 83055-99-6

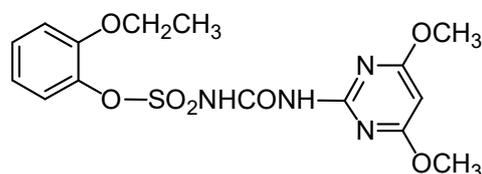
Cyclosulfamuron



1-[2-(cyclopropylcarbonyl)phenylsulfamoyl]-3-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)urea

C₁₇H₁₉N₅O₆S MW: 421.43 CAS No.: 136849-15-5

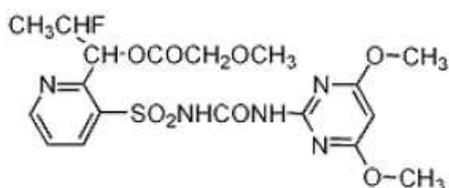
Ethoxysulfuron



1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-(2-ethoxyphenoxy-sulfonyl)urea

C₁₅H₁₈N₄O₇S MW: 398.39 CAS No.: 126801-58-9

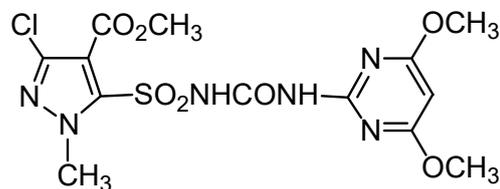
Flucetosulfuron



1-{3-[(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoyl)sulfamoyl]-2-pyridyl}-2-fluoropropyl methoxyacetate

C₁₈H₂₂FN₅O₈S MW: 487.46 CAS No.: 412928-75-7

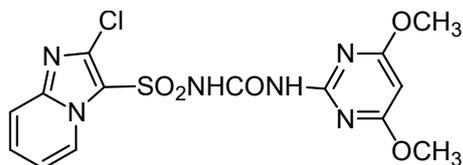
Halosulfuron-methyl



methyl 3-chloro-5-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoylsulfamoyl)-1-methylpyrazole-4-carboxylate

C₁₃H₁₅ClN₆O₇S MW: 434.81 CAS No.: 100784-20-1

Imazosulfuron



1-(2-chloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-ylsulfonyl)-3-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)urea

C₁₄H₁₃ClN₆O₅S MW: 412.81 CAS No.: 122548-33-8

Fig. 1 Chemical structures of azimsulfuron, bensulfuron-methyl, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron

2 実験方法

2.1 試料

稲わらはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し、分析用試料とした。稲発酵粗飼料は 60 °C で 10 時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉碎し、分析用試料とした。

2.2 試薬

1) アセトニトリル、アセトン、酢酸エチル、ヘキサン及びトルエンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは LC-MS 用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。塩酸及びギ酸（質量分率 98 %）は試薬特級を用いた。酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用（1 %溶液、富士フイルム和光純薬製）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) 農薬標準品

アジムスルフロン、ベンスルフロンメチル、シクロスルファムロン、エトキシスルフロン、フルセトスルフロン、ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンの各標準品は、Table 1 に示した供給業者、純度のものを用いた。

Table 1 Pesticide standards used in this study

Compound	Manufacturer	Purity(%)
Azimsulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.9
Bensulfuron-methyl	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	100
Cyclosulfamuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.3
Ethoxysulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.7
Flucetosulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.6
Halosulfuron-methyl	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.9
Imazosulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	100

3) 農薬標準原液

農薬標準品各 25 mg を量ってそれぞれ 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各農薬標準原液を調製した（これらの液各 1 mL は、各農薬として 0.5 mg を含有）。

4) 農薬混合標準液

7 成分の農薬標準原液各 1 mL を 25 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し、更に標線までアセトンを加えて農薬混合標準原液を調製した（この液 1 mL は、各農薬として 20 µg を含有）。

使用に際して、農薬混合標準原液の一部を、アセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬として 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng を含有する農薬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（目開き 1 mm スクリーン、回転数（仕様）1430 rpm）
- 2) 振り混ぜ機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）

- 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) グラファイトカーボンミニカラム (以下「ミニカラム」という.) : ENVI-Carb (500 mg) Sigma-Aldrich 製
- 5) メンブランフィルター : DISMIC-25HP (孔径 0.20 μm , 直径 25 mm, 親水性 PTFE) 東洋濾紙製
- 6) 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 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ, 水 30 mL を加え, 30 分間静置後, 更にアセトン 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 10 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 2 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

試料溶液に 0.1 mol/L 塩酸 2.5 mL を加え軽く振り混ぜた後, 多孔性ケイソウ土カラム (5 mL 保持用) 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なす形フラスコをヘキサン-酢酸エチル (3+1) 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た後, 更にヘキサン-酢酸エチル (3+1) 40 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. アセトニトリル-水-ギ酸 (50+50+1) 10 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

ミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び 1 v/v%ギ酸溶液 5 mL で順次洗浄した. 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 (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.) した. 試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル-ギ酸 (99+1) 5 mL ずつで 2 回洗浄し, 洗液をミニカラムに加え, 同様に流出させた.

100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, アセトニトリル-トルエン-ギ酸 (75+25+1) 30 mL をミニカラムに加えて各農薬を溶出させた.

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. アセトニトリル-水 (1+1) 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし, メンブランフィルターでろ過し, LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした. また, 必要に応じて試料溶液の一部をアセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し, 同様に LC-MS/MS による測定に供した.

4) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各農薬混合標準液各 4 μ 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 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	Mightysil RP-18 GP (2.0 mm i.d. \times 150 mm, 5 μ m), Kanto Chemical
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate- methanol (9:1) \rightarrow 5 min \rightarrow (1:1) (hold for 15 min) \rightarrow (1:9) (hold for 15 min) \rightarrow 5 min \rightarrow (9:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI) (Positive ion mode)
Ion source temperature	120 $^{\circ}$ C
Desolvation gas	N ₂ (600 L/h, 400 $^{\circ}$ C)
Capillary voltage	1.0 kV
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
Azimsulfuron	425	182	—	25	15
		—	156	25	36
Bensulfuron-methyl	411	149	—	28	21
		—	91	28	58
Cyclosulfamuron	422	261	—	25	16
		—	218	25	27
Ethoxysulfuron	399	261	—	27	14
		—	218	27	24
Flucetosulfuron	488	156	—	32	17
		—	273	32	23
Halosulfuron-methyl	435	182	—	27	20
		—	83	27	52
Imazosulfuron	413	153	—	22	10
		—	258	22	23

5) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のベンスルフロンメチル等の量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

- Sample 10.0 g (300 mL Erlenmeyer flask)
- added 30 mL of water and allowed to stand for 30 min
 - added 120 mL of acetone and shook for 30 min
 - filtered through filter paper (No. 5B of JIS P3801) under reduced pressure
 - washed with 50 mL of acetone
 - filled up to 200 mL with acetone
 - transferred 10 mL of sample solution to 50 mL evaporator flask
 - evaporated to the volume of 2 mL under 40 °C
 - added 2.5 mL of 0.1 mol/L hydrochloric acid
- InertSep K-solute (applicable sample volume 5mL)
- placed a receiver (100 mL evaporator flask)
 - applied sample solution and allowed to stand for 10 min
 - washed the 50 mL evaporator flask with 5 mL of hexane-ethyl acetate (3:1) and eluted (twice)
 - eluted with 40 mL of hexane-ethyl acetate (3:1)
 - evaporated under 40 °C and dried with nitrogen gas
 - added 10 mL of acetonitrile-water-formic acid (50:50:1)
- ENVI-carb (500 mg)
- washed with 5 mL of acetonitrile and 5 mL of 1 v/v% formic acid solution
 - applied sample solution
 - washed the evaporator flask with 5 mL of acetonitrile-formic acid (99:1) and eluted (twice)
 - placed a receiver (100 mL evaporator flask)
 - eluted with 30 mL of acetonitrile-toluene-formic acid (75:25:1)
 - evaporated under 40 °C and dried with nitrogen gas
 - added 5 mL of acetonitrile-water (1:1)
 - filtered through a membrane filter (0.2 µm)
 - (five-fold dilution with acetonitrile-water (1:1))
- LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for azimsurufuron, bensulfuron-methyl, cyclosurufamuron, etoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron in rice straw and whole-crop rice silage (WCRS)

2.5 添加回収試験

2.2 の 4) の農薬混合標準原液をアセトンで正確に希釈し添加に用いた。

各農薬として、稲わらに 0.04 及び 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 4 及び 50 ng/mL）、WCRS に原物換算して 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量（同 4 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 2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。同時に、この試料溶液をアセトニトリル-水 (1+1) で 4 倍又は 5 倍に希釈したのもも定量した。

なお WCRS について、添加は風乾物試料に対して各農薬として 0.04 及び 0.5 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。

3 結果及び考察

3.1 マトリックス効果の確認

令和3年度の検討において、最終試料溶液を希釈することによりマトリックス効果を低減できる可能性が認められた。そこで、2.4の1)から3)により調製した稲わら及びWCRSのブランク試料溶液に各農薬として0.1 mg/kg相当量（希釈しない最終試料溶液中で10 ng/mL相当量）を添加した各マトリックス標準液並びに同マトリックス標準液をアセトニトリル-水（1+1）で4倍及び5倍に希釈した液それぞれについて、2.2の4)に従って調製した同濃度の農薬混合標準液に対するピーク面積比を確認した。その結果はTable 4のとおりであり、アジムスルフロン、ベンスルフロンメチル、シクロスルファムロン、エトキシスルフロン及びフルセトスルフロンについて、マトリックスによる影響は認められなかった。ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンについては試料溶液を4倍又は5倍希釈することで、農薬混合標準液に対するピーク面積比が80~120%以内となり、試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。

Table 4 Matrix effect study by diluted sample solution

Pesticides	Matrix effect ^{a)} (%)					
	Rice straw			WCRS		
	×1 ^{b)}	×4 ^{c)}	×5 ^{d)}	×1 ^{b)}	×4 ^{c)}	×5 ^{d)}
Azimsulfuron	93.5	102	96.5	88.0	99.1	96.2
Bensulfuron-methyl	99.1	105	106	98.1	101	102
Cyclosulfamuron	101	103	104	98.5	99.7	104
Ethoxysulfuron	94.6	104	100	96.3	100	100
Flucetosulfuron	87.5	99.5	101	92.1	101	99.8
Halosulfuron-methyl	74.2	97.9	97.0	77.0	96.3	96.2
Imazosulfuron	72.1	91.0	97.5	72.3	92.1	90.0

$n = 3$

a) Ratio of peak area of pesticides in the presence of matrix to that in the absence of matrix. The concentration in matrix standard solution was 10 ng/mL (spiked at 0.1 mg/kg as air-dry basis).

b) No dilution

c) 4-times dilution

d) 5-times dilution

3.2 添加回収試験

2.5により添加回収試験を実施した。その結果はTable 5のとおり、ベンスルフロンメチル及びシクロスルファムロンについては、試料溶液を希釈しない場合で平均回収率はそれぞれ91.7~120%及び89.7~118%、その繰返し精度は相対標準偏差（RSD_r）としてそれぞれ3.2%以下及び3.4%以下の成績が得られた。アジムスルフロン、エトキシスルフロン、フルセトスルフロン、ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンについては、試料溶液を5倍希釈した場合で平均回収率はそれぞれ84.1~96.0%、70.7~90.0%、72.6~85.7%、71.4~82.8%及び75.2~82.5%、RSD_rはそれぞれ8.4%以下、4.7%以下、6.4%以下、8.9%以下及び15%以下の成績が得られた。これらは妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（真度：70%以上120%以下、精度：0.04

mg/kg では 22 %以下, 0.5 mg/kg では 18 %以下) 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. 2 に示した.

Table 5 Recoveries for pesticides (1)

Pesticides	Feed types	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Dilution ratio	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
Azimsulfuron	Rice straw	0.04	×1 ^{d)}	50.2	2.3
			×4 ^{e)}	83.6	3.8
			×5 ^{f)}	87.2	5.7
	WCRS	0.5	×1	81.0	6.4
			×4	93.4	5.5
			×5	96.0	7.0
		0.02	×1	79.8	7.1
			×4	85.3	2.2
			×5	84.1	3.7
Bensulfuron-methyl	Rice straw	0.04	×1	91.7	1.9
			×4	99.5	3.2
			×5	103	3.7
	WCRS	0.5	×1	116	3.2
			×4	120	3.8
			×5	123	2.7
		0.02	×1	120	1.4
			×4	120	5.0
			×5	120	2.4
Cyclosulfamuron	Rice straw	0.04	×1	89.7	3.4
			×4	92.0	2.7
			×5	94.7	3.8
	WCRS	0.5	×1	109	2.0
			×4	117	3.4
			×5	119	3.3
		0.02	×1	116	1.4
			×4	118	3.7
			×5	113	2.5
Ethoxysulfuron	Rice straw	0.04	×1	62.0	3.6
			×4	71.9	7.4
			×5	77.5	4.7
	WCRS	0.5	×1	83.9	2.4
			×4	89.2	2.2
			×5	90.0	2.5
		0.02	×1	71.9	3.6
			×4	69.9	3.2
			×5	70.7	1.4
0.2	×1	74.8	1.2		
	×4	74.1	2.0		
	×5	76.9	3.8		

Table 5 Recoveries for pesticides (2)

Pesticides	Feed types	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Dilution ratio	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
Flucetosulfuron	Rice straw	0.04	×1	59.0	3.8
			×4	75.6	5.8
			×5	85.7	5.8
		0.5	×1	76.0	2.7
			×4	84.0	3.2
			×5	84.9	5.4
	WCRS	0.02	×1	69.5	4.2
			×4	70.9	4.3
			×5	72.6	6.4
		0.2	×1	72.8	9.7
			×4	72.9	3.3
			×5	75.8	6.0
Halosulfuron-methyl	Rice straw	0.04	×1	47.8	2.0
			×4	74.3	8.0
			×5	82.8	7.7
		0.5	×1	61.7	3.2
			×4	78.1	4.8
			×5	80.6	5.1
	WCRS	0.02	×1	58.5	2.2
			×4	71.8	3.6
			×5	71.4	5.0
		0.2	×1	62.8	6.4
			×4	72.5	6.1
			×5	75.4	8.9
Imazosulfuron	Rice straw	0.04	×1	46.8	5.8
			×4	75.1	7.2
			×5	78.8	15
		0.5	×1	62.5	6.4
			×4	78.6	6.4
			×5	82.5	5.8
	WCRS	0.02	×1	61.1	10
			×4	75.1	4.9
			×5	75.3	2.8
		0.2	×1	64.9	8.8
			×4	70.9	8.8
			×5	75.2	7.3

a) The pesticides were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.04 and 0.5 mg/kg as air-dry basis for each pesticide. The levels of each pesticide as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

The levels of pesticides as fed basis (moisture 60 %)

= the levels of pesticides as air-dry basis (moisture 10 %) / 2.25

b) Mean ($n = 5$)

c) Relative standard deviation of repeatability

d) No dilution

e) 4-times dilution

f) 5-times dilution

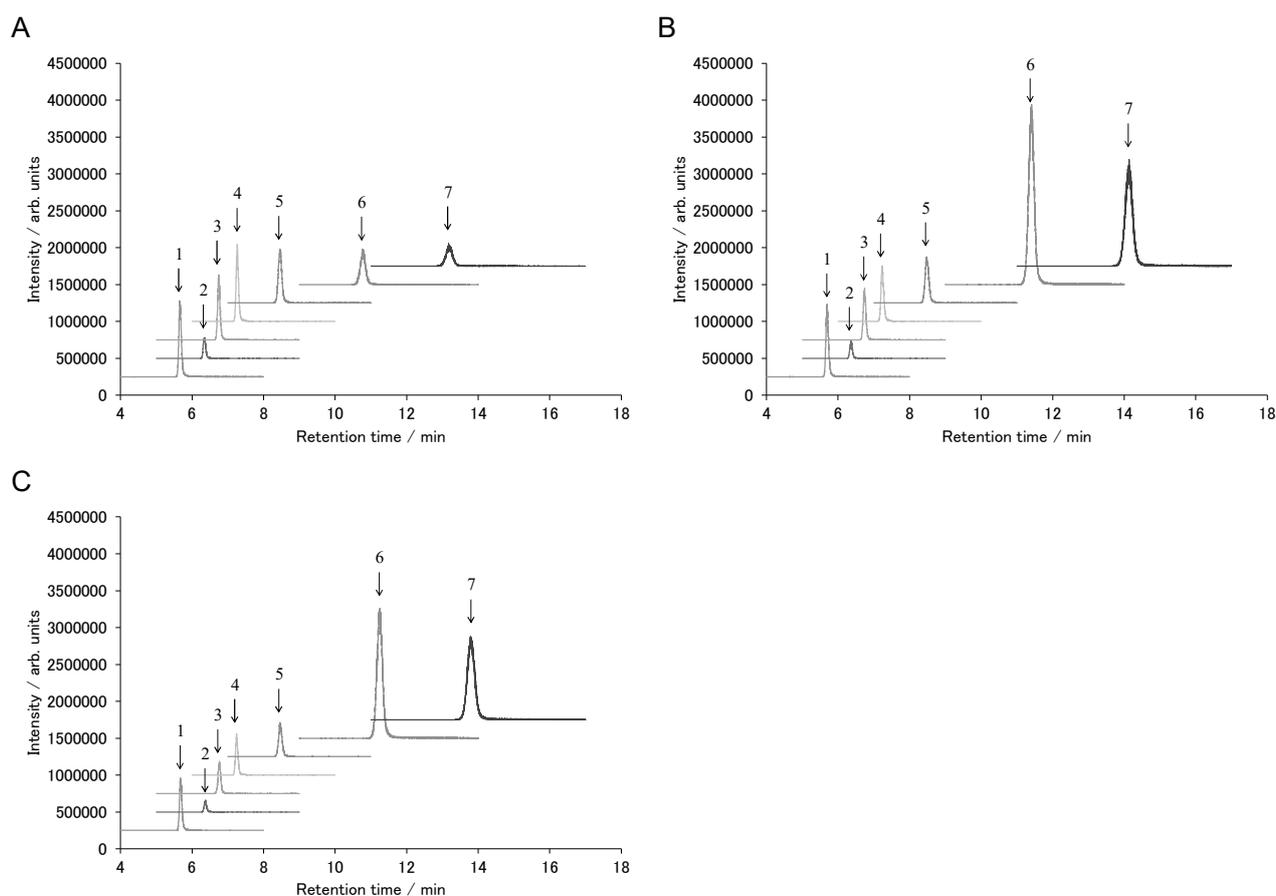


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring chromatograms of pesticides in standard and spiked sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention times of 1: azimsulfuron, 2: imazosulfuron, 3: flucetosulfuron, 4: halosulfuron-methyl, 5: ethoxysulfuron, 6: bensulfuron-methyl and 7: cyclosulfamuron. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (10 ng/mL: 0.04 ng as each pesticide)

B: Sample solution of rice straw (spiked at 0.5 mg/kg of azimsulfuron, imazosulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and ethoxysulfuron (as 10 ng/mL: 0.04 ng in five-fold diluted sample solution) and at 0.5 mg/kg bensulfuron-methyl and cyclosulfamuron (as 50 ng/mL: 0.2 ng in sample solution))

C: Sample solution of WCRS (spiked at 0.5 mg/kg of azimsulfuron, imazosulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and ethoxysulfuron (as 10 ng/mL: in five-fold diluted sample solution) and at 0.5 mg/kg of bensulfuron-methyl and cyclosulfamuron (as 50 ng/mL: 0.2 ng in sample solution))

3.3 定量下限及び検出下限

令和3年度の検討において、ベンスルフロンメチル及びシクロスルファムロンを除く5農薬の検量線が直線性を示した範囲、各0.5~100 ng/mLの下端付近となる濃度（稲わら中で0.04 mg/kg相当量（5倍希釈した試料溶液中で0.8 ng/mL相当量））の添加回収試験の結果はTable 5のとおり良好であり、得られたピークのSN比が10以上であったため、それら5農薬の定量下限の濃度

は 0.04 mg/kg とした。この濃度は、5 農薬の中で唯一管理基準値が設定されている、ハロスルフロロンメチルの稲わら及び WCRS 中の管理基準値の風乾物中換算値（それぞれ 0.2 mg/kg 及び 0.225 mg/kg）に対してそれぞれ 1/5 及び 8/45 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（基準値 0.1 mg/kg 未満：2/5 以下，基準値 0.1 mg/kg 以上：1/5 以下）を満たしていた。なお、最終試料溶液を希釈せずに測定するベンズルスフロロンメチル及びシクロスルファムロンの定量下限の濃度は、令和 3 年度の検討に基づき 0.01 mg/kg とした。

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、検出下限は試料中でベンズルスフロロンメチル及びシクロスルファムロンを除く 5 農薬で 0.01 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値（基準値 0.1 mg/kg 未満：1/5 以下，基準値 0.1 mg/kg 以上：1/10 以下）を満たしていた。なお、最終試料溶液を希釈せずに測定するベンズルスフロロンメチル及びシクロスルファムロンの検出下限は、令和 3 年度の検討に基づき 0.003 mg/kg とした。

4 まとめ

飼料用稲（稲わら及び WCRS）に残留するアジムスルフロロン，ベンズルスフロロンメチル，シクロスルファムロン，エトキシスルフロロン，フルセトスルフロロン，ハロスルフロロンメチル及びイマズスルフロロンについて，JFRL 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収載の可否について検討したところ，ベンズルスフロロンメチル及びシクロスルファムロンについては最終試料溶液を希釈せずに，他の 5 農薬については稲わら及び WCRS 中のマトリックスによる影響を低減するため，最終試料溶液を 5 倍希釈することで以下の結果が得られた。

- 1) 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，各試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。
- 2) 各農薬として稲わらに 0.04 及び 0.5 mg/kg 相当量，WCRS に原物換算して 0.02 及び 0.2 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していた。
- 3) 本法のベンズルスフロロンメチル及びシクロスルファムロン（試料溶液を希釈せずに測定）の定量下限は 0.01 mg/kg，検出下限は 0.003 mg/kg であった。他の 5 農薬（試料溶液を 5 倍希釈して測定）の定量下限は 0.04 mg/kg，検出下限は 0.01 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) 食品安全委員会農薬専門調査会：農薬評価書 ベンズルスフロロンメチル，平成 22 年 10 月 (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) 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).
- 4) 武田 然也，船木 紀夫，関口 好浩：飼料用稲中のベンズルスフロロンメ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分析法の開発，飼料研究報告，47，46-61 (2022).

- 5) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 25 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 (2014).
- 6) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 27 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 (2016).
- 7) 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 飼料
中の有害物質等の分析法の開発 (2010).

2 稲わら及び稲発酵粗飼料中のベンフラカルブ及びカルボスルファン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分析法の開発

齊木 雅一*, 平田 絵理香*, 近藤 勝*, 船水 悦子*

Development of Simultaneous Determination Method of Benfuracarb and Carbosulfan in Rice Straw and Whole-Crop Rice Silage by LC-MS/MS

SAIKI Masakazu*, HIRATA Erika*, KONDO Masaru* and FUNAMIZU Etsuko*

(* Sapporo Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

We have developed a quantitative determination method of the concentration of benfuracarb and carbosulfan in rice straw and whole-crop rice silage (WCRS) using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Having added silver nitrate solution and phosphate buffer (pH 8.0) to a sample, benfuracarb and carbosulfan were extracted with acetone, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then diluted with phosphate buffer. Benfuracarb and carbosulfan were extracted from the diluted solution with hexane-ethyl acetate (7:3). The hexane-ethyl acetate layer was purified with a solid phase extraction column (ENVI-Carb/LC-NH₂, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA), and injected into the LC-MS/MS to determine the levels of benfuracarb and carbosulfan. LC separation was then carried out on a ODS column (Mightysil RP-18GP, 2.0 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Kanto Chemical Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on rice straw and WCRS. Benfuracarb and carbosulfan were added at the levels of 0.7 mg/kg for rice straw, and 1 mg/kg for WCRS respectively. The resulting mean recoveries ranged from 86.6 % to 89.3 % for benfuracarb, and 83.1 % to 83.4 % for carbosulfan respectively. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 9.9 % for benfuracarb, and less than 7.2 % for carbosulfan.

Key words: benfuracarb; carbosulfan; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice straw; whole-crop rice silage

キーワード：ベンフラカルブ；カルボスルファン；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；稲わら；稲発酵粗飼料

1 緒 言

ベンフラカルブは大塚化学，カルボスルファンは FMC（米国）により開発されたカーバメート系殺虫剤であり，昆虫の神経伝達系に存在するアセチルコリンエステラーゼの活性を阻害することにより殺虫活性を示すと考えられている¹⁾。我が国では，ベンフラカルブは 1986 年に，カルボスルファンは 1983 年に初回農薬登録されている。カルボスルファンについては，飼料中の管理基準値²⁾として，稲わらで 0.7 mg/kg，稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で 1 mg/kg が設定されているが，分析法が飼料分析基準³⁾に記載されていない。また，ベンフラカルブについては飼料中

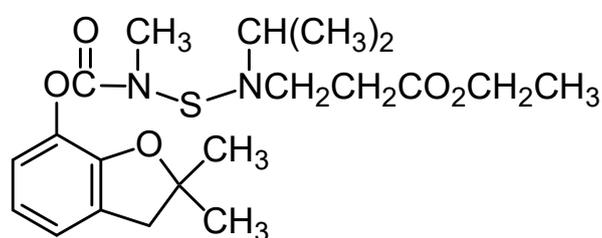
* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

の基準値は設定されていないものの、ベンフラカルブ及びカルボスルファンの共通代謝・分解物であるカルボフラン又は 3-OH カルボフランが検出された場合、その親化合物を確認するため、ベンフラカルブとカルボスルファンは同時に分析できることが望ましいと考えられる。

財団法人日本食品分析センターが平成 21 年度⁴⁾及び平成 23 年度⁵⁾に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飼料中のベンフラカルブ及びカルボスルファンの分析法（以下「JFRL 法」という。）を基に、令和 3 年度、顯谷ら⁶⁾が稲わら及び WCRS を対象として飼料分析基準への収載の可否を検討したところ、JFRL 法で用いられているオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムでは当該農薬の一部が溶出されないことが判明した。

そこで、今回、厚生労働省通知試験法⁷⁾を基に、稲わら及び WCRS 中のベンフラカルブ及びカルボスルファンの液体クロマトグラフト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、飼料分析基準への収載の可否を検討したので、その概要を報告する。

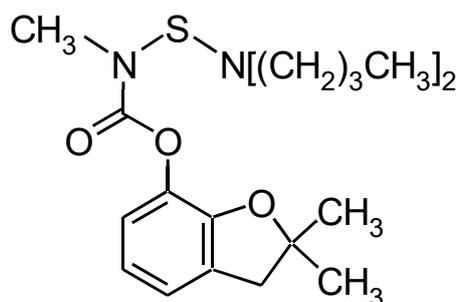
参考にベンフラカルブ及びカルボスルファンの構造式等を Fig. 1 に示した。



Benfuracarb

ethyl *N*-[2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl]oxycarbonyl(methyl)-aminothio]-*N*-isopropyl-β-alaninate

C₂₀H₃₀N₂O₅S MW: 410.53 CAS No.: 82560-54-1



Carbosulfan

2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl(dibutylaminothio)methylcarbamate

C₂₀H₃₂N₂O₃S MW: 380.54 CAS No.: 55285-14-8

Fig. 1 Chemical structure of benfuracarb and carbosulfan

2 実験方法

2.1 試料

稲わらは目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し、分析用試料とした。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，同様に粉碎し，分析用試料とした。

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。アセトニトリルは残留農薬・PCB 試験用及び LC-MS 用（関東化学製）を用いた。1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）を用いた。硝酸銀，リン酸水素二ナトリウム及びリン酸二水素カリウムは試薬特級を用いた。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) 1/15 mol/L リン酸緩衝液（pH 8.0）

1/15 mol/L リン酸水素二ナトリウム溶液 800 mL に 1/15 mol/L リン酸二水素カリウム溶液 50 mL を加え，更に 1/15 mol/L リン酸二水素カリウム溶液で pH 8.0 に調整した。

3) ベンフラカルブ標準原液

ベンフラカルブ標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 99.6%）25 mg を量って 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ベンフラカルブ標準原液を調製した（この液 1 mL は，ベンフラカルブとして 0.5 mg を含有）。

4) カルボスルファン標準原液

カルボスルファン標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 99.8%）25 mg を量って 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スルファン標準原液を調製した（この液 1 mL は，カルボスルファンとして 0.5 mg を含有）。

5) 混合標準液

各標準原液 1 mL を 50 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，ベンフラカルブ及びカルボスルファンとして各 10 µg を含有）。

使用に際して，混合標準原液の一部を，アセトニトリルで正確に希釈し，1 mL 中にベンフラカルブ及びカルボスルファンとして 0.05，0.075，0.1，0.25，0.5，0.75，1，2，3，4 及び 5 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) 粉碎機：SM 100 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数（仕様）1430 rpm）

2) 振り混ぜ機：レシプロシユーカー SR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）

3) 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「ミニカラム」という。）：ENVI-Carb/LC-NH₂（500 mg/500 mg）Sigma-Aldrich 製

4) LC-MS/MS：

LC 部：ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部：Quattro Premier XE Waters 製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10 g を量って 500 mL の共栓三角フラスコに入れ，0.1 mol/L 硝酸銀溶液 2 mL 及び 1/15 mol/L リン酸緩衝液 30 mL を加え，30 分間静置後，更にアセトン 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 40 mL で洗浄し，同様に吸

引り過した。更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液を、液液分配に供する試料溶液とした。

2) 液液分配

試料溶液の一部を 1/15 mol/L リン酸緩衝液で正確に 20 倍に希釈した。希釈液 2 mL を 10 mL 共栓遠心沈殿管に正確に入れ、1/15 mol/L リン酸緩衝液 1 mL を加えた後、ヘキササン-酢酸エチル (7+3) 5 mL を正確に加え、栓をしてボルテックスミキサーを用いて 30 秒間激しくかき混ぜた。100×g で 5 秒間遠心分離し、上層 (ヘキササン-酢酸エチル層) をカラム処理に供する試料溶液とした。

3) カラム処理

ミニカラムを酢酸エチル 5 mL 及びヘキササン 5 mL で洗浄した。50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液 2 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、ベンフラカルブ及びカルボスルファンを流出させた。更に、ヘキササン-酢酸エチル (7+3) 8 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。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

試料溶液及び各混合標準液各 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 1 及び 2 に示した。

Table 1 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	Mightysil RP-18GP (2 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), Kanto Chemical
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate – acetonitrile (1:1) → 3 min → (1:19) (hold for 15 min) → (1:1) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI) (Positive ion mode)
Ion source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ (800 L/h, 400 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	2.5 kV
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

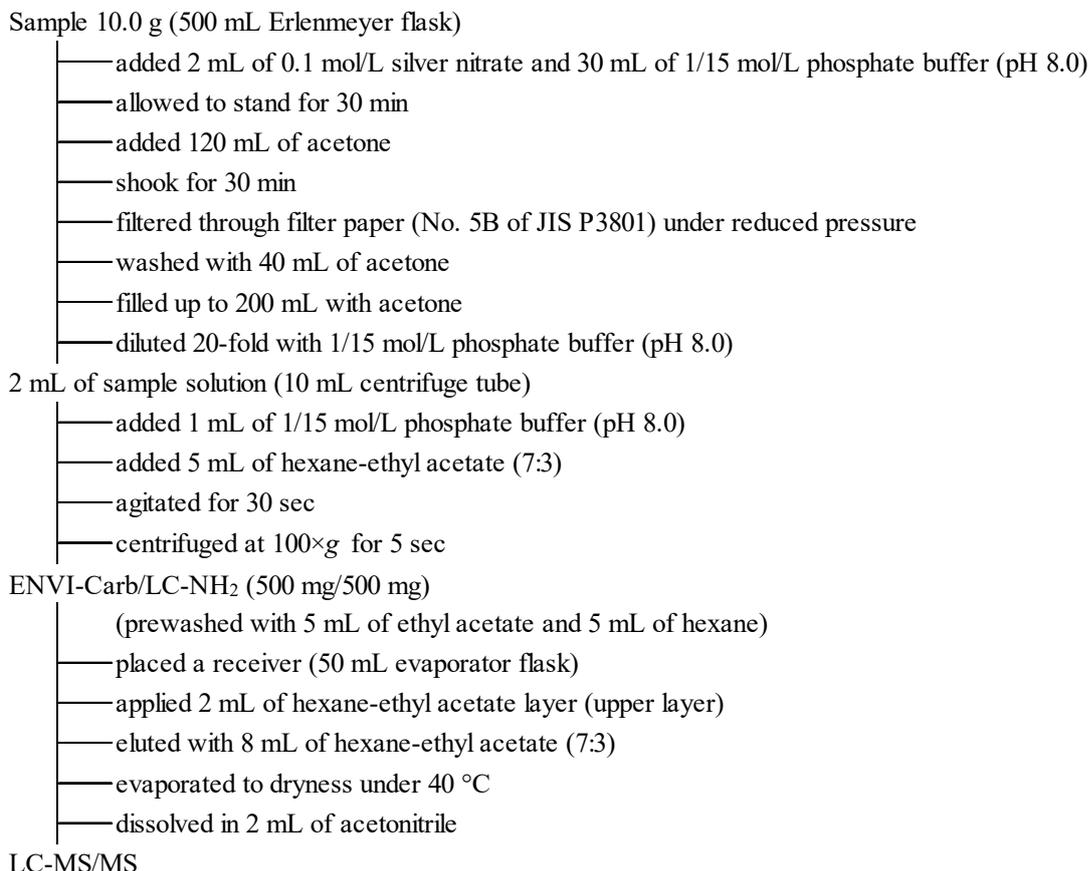
Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
Benfuracarb	411	195	-	46	31
		-	190	46	17
Carbosulfan	381	118	-	21	27
		-	160	21	21

5) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のベンフラカルブ量及びカルボスルファン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for benfuracarb and carbosulfan in rice straw and whole-crop silage (WCRS)

2.5 液液分配に用いる抽出溶媒及び抽出回数確認

稲わら及び WCRS を 2.4 の 1) に従って抽出、ろ過及び定容した液 2.5 mL を 50 mL の全量フラスコに分取した。これにベンフラカルブ及びカルボスルファンとして稲わらに 0.7 mg/kg 相当量、WCRS に 2 mg/kg 相当量を添加し標線まで 1/15 mol/L リン酸緩衝液を加えた。この液 2 mL を 10 mL 共栓遠心沈殿管に正確に入れ、1/15 mol/L リン酸緩衝液 1 mL を加えた後、ヘキサン、ヘキサノン-酢酸エチル (7+3) 又はヘキサノン-酢酸エチル (1+1) 5 mL をそれぞれ正確に加え、ボルテックスミキサーを用いて 30 秒間激しくかき混ぜた。100×g で 5 秒間遠心分離し、ヘキサノン-酢酸エチル層 2 mL を 50 mL なす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、2.4 の 4) 及び 5) に従い定量し、回収率を求めた。先の共栓遠心沈殿管の下層 (水層) 全量を別の 10 mL 共栓遠心沈殿管に入れ、ヘキサン、ヘキサノン-酢酸エチル (7+3) 又はヘキサノン-酢酸エチル (1+1) 5 mL をそれぞれ正確に加え、同様に回収率を求めた。

2.6 添加回収試験

2.2 の 3)及び 4)のベンフラカルブ標準原液及びカルボスルファン標準原液をアセトニトリルで正確に希釈し添加に用いた。

ベンフラカルブ及びカルボスルファンとしてそれぞれ、稲わらに 0.7 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.7 ng/mL），WCRS に原物換算して 1 mg/kg 相当量（同 2.25 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 2.4 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 への添加は風乾物試料に対してベンフラカルブ及びカルボスルファンとして 2.25 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。

3 結果及び考察

3.1 液液分配に用いる抽出溶媒及び抽出回数検討

令和 3 年度、ベンフラカルブ及びカルボスルファンの添加回収試験において飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた目標値を満たす結果が得られなかった。その原因を調査したところ、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム等の高い保持能力を持つ逆相のミニカラムからはヘキサンなどの無極性溶媒を用いても十分に溶出しないこと、多孔性ケイソウ土カラムからは酢酸エチルを用いても十分に溶出しないことが判明した。そこで、厚生労働省通知試験法を参考に、液液分配による精製を検討することとした。

厚生労働省通知試験法では、抽出液に 10 w/v%塩化ナトリウム溶液を加えヘキサン－酢酸エチル（1+1）100 mL 及び 50 mL で 2 回振り混ぜ抽出を行っている。操作の簡略化及び溶媒等の試薬の使用量削減のために遠心沈殿管を用いる方法として、2.5 に従って検討を行った。その結果は Table 3 のとおりであり、ヘキサンを用いた場合は、1 回目の抽出で 70 % 以上回収され、2 回目も一部が回収されたが、ヘキサン－酢酸エチル（7+3）及びヘキサン－酢酸エチル（1+1）では 1 回目の抽出で 80 % 以上回収され、2 回目は検出されなかった。そこで、次のカラム処理操作への水の混入を最小限にするため、酢酸エチルの割合が少ないヘキサン－酢酸エチル（7+3）5 mL で 1 回抽出を行うこととした。

Table 3 Recoveries on extraction solvents and extraction numbers of the liquid-liquid partition

Pesticides	Samples	Solvents	Recovery (%)		
			First time	Second time	Total
Benfuracarb	Rice straw	Hexane	89	0	89
		Hexane-ethyl acetate (7:3)	85	0	85
		Hexane-ethyl acetate (1:1)	86	0	86
	WCRS	Hexane	98	1	98
		Hexane-ethyl acetate (7:3)	97	0	97
		Hexane-ethyl acetate (1:1)	96	0	96
Carbosulfan	Rice straw	Hexane	73	1	74
		Hexane-ethyl acetate (7:3)	84	0	84
		Hexane-ethyl acetate (1:1)	81	0	81
	WCRS	Hexane	70	14	84
		Hexane-ethyl acetate (7:3)	96	0	96
		Hexane-ethyl acetate (1:1)	101	0	101

n = 3

3.2 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からの流出画分の確認

厚生労働省通知試験法では、液液分配の抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水、ろ過、濃縮乾固後にグラファイトカーボンミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムの2種類のミニカラムを用いて精製している。そこで、操作の簡略化のために、液液分配のヘキサナー酢酸エチル層の一部を直接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に負荷して精製する方法の検討を行った。

稲わらを 2.4 の 1)から 2)により調製し、得られた試料溶液にベンフラカルブ及びカルボスルファンとして 0.7 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.7 ng/mL 相当量）を添加した後、2.4 3)に準じてミニカラムからの流出画分を確認した。その結果は Table 4 のとおりであり、ヘキサナー酢酸エチル（7+3）0~10 mL の画分でベンフラカルブ及びカルボスルファンが流出し、10~20 mL の画分に溶出は認められなかった。このことから、ヘキサナー酢酸エチル（7+3）10 mL（試料溶液 2 mL 及び流出溶媒 8 mL）で流出させることとした。

Table 4 Elution pattern of benfuracarb and carbosulfan from ENVI-Carb/LC-NH₂

Pesticides	Recovery (%)		Total
	Hexane-ethyl acetate (7:3)		
	0~10 mL	10~20 mL	
Benfuracarb	97	0	97
Carbosulfan	99	0	99

n = 3

3.3 妨害物質の検討

稲わら 3 検体及び WCRS 3 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ラカルブ及び

カルボスルファンの選択性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. 2 に示した。

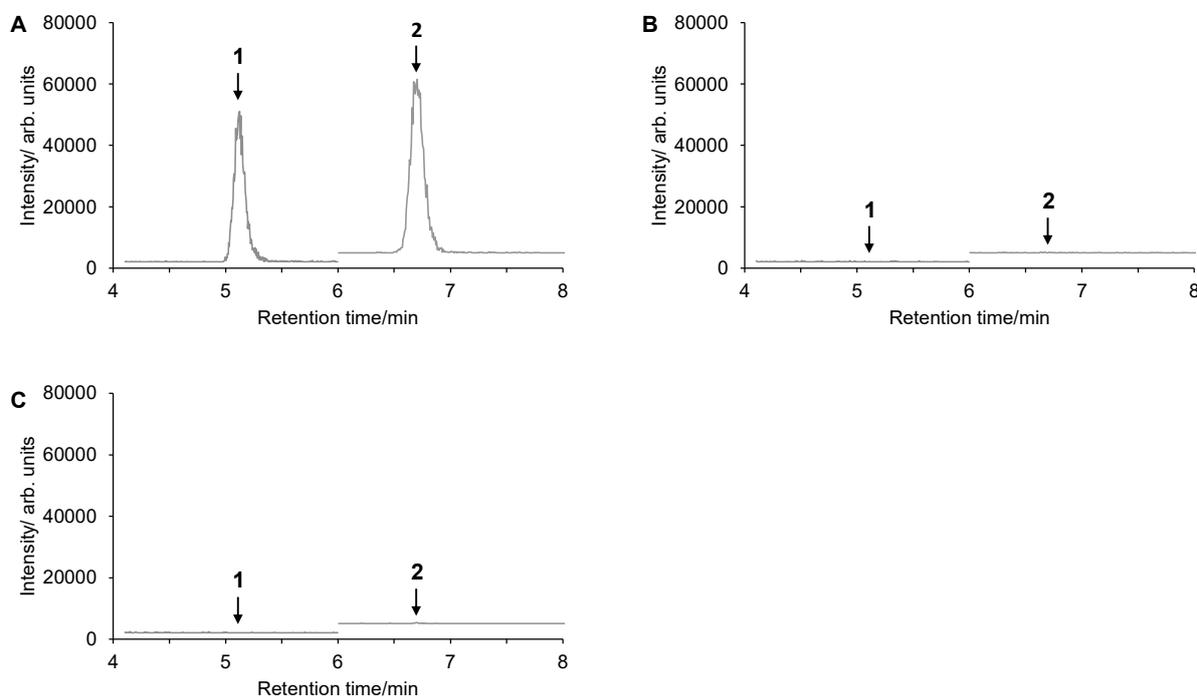


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of benfuracarb and carbosulfan in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Table 1 and 2. Arrows indicate the retention times of 1: benfuracarb and 2: carbosulfan. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (0.1 ng/mL: 0.2 pg as each pesticide)

B: Sample solution of rice straw

C: Sample solution of WCRS

3.4 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 3)により調製した稲わらのブランク試料溶液にベンフラカルブ及びカルボスルファンとしてそれぞれ 0.7 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中でそれぞれ 0.7 ng/mL 相当量) , WCRS のブランク試料溶液に同 2.25 mg/kg 相当量 (同 2.25 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ベンフラカルブ及びカルボスルファン標準液に対するピーク面積比を確認したところ, Table 5 のとおりであり, 試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。

Table 5 Matrix effect study

Pesticides	Samples	Concentration of pesticides		Matrix effect ^{b)} (%)
		Matrix standard solution (ng/mL)	Sample ^{a)} (mg/kg air-dry matter)	
Benfuracarb	Rice straw	0.7	0.7	89
	WCRS	2.25	2.25	94
Carbosulfan	Rice straw	0.7	0.7	91
	WCRS	2.25	2.25	92

$n = 3$

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

3.5 添加回収試験

2.6により添加回収試験を実施した。その結果はTable 6のとおり、ベンフラカルブについては平均回収率は86.6~89.3%，その繰返し精度は相対標準偏差（ RSD_r ）としては9.9%以下、カルボスルファンについては平均回収率は83.1~83.4%， RSD_r は7.2%以下の成績が得られ、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（真度：70%以上120%以下，精度：0.7 mg/kgでは17%以下，2.25 mg/kgでは14%以下）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. 3に示した。

Table 6 Recoveries for benfuracarb and carbosulfan

Pesticides	Spiked level (mg/kg original matter) ^{a)}	Rice Straw		WCRS	
		Recovery ^{b)} (%)	RSD_r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD_r ^{c)} (%)
Benfuracarb	0.7	86.6	9.9	—	—
	1	—	—	89.3	8.5
Carbosulfan	0.7	83.4	7.2	—	—
	1	—	—	83.1	5.2

—: Not tested

a) The benfuracarb and carbosulfan were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked level was 2.25 mg/kg as air-dry basis for benfuracarb and carbosulfan. The levels of pesticides as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60% for fed basis and 10% for air-dry basis.

The levels of pesticides as fed basis (moisture 60%)

= the levels of pesticides as air-dry basis (moisture 10%) / 2.25

b) Mean ($n = 5$)

c) Relative standard deviation of repeatability

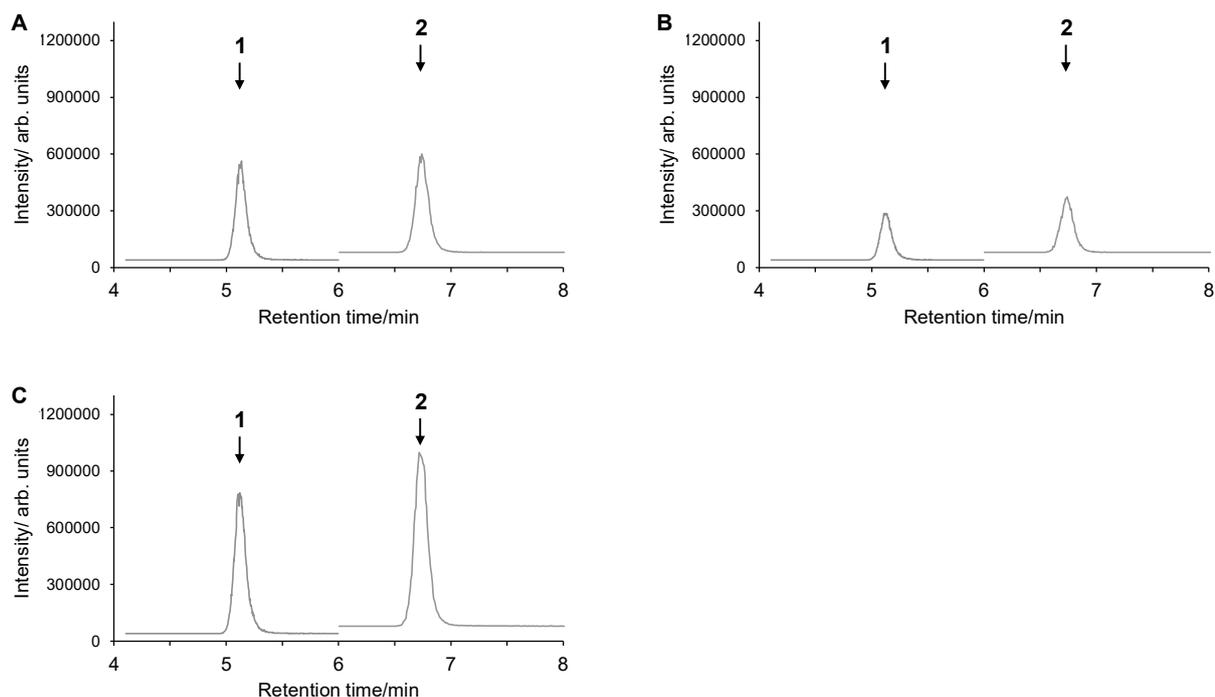


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of benfuracarb and carbosulfan in standard and spiked sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Table 1 and 2. Arrows indicate the peaks of 1: benfuracarb and 2: carbosulfan. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (1 ng/mL: 2 pg as benfuracarb and carbosulfan)

B: Sample solution of rice straw (spiked at 0.7 mg/kg of benfuracarb and carbosulfan (as 0.7 ng/mL in sample solution))

C: Sample solution of WCRS (spiked at 2.25 mg/kg fed basis of benfuracarb and carbosulfan (as 2.25 ng/mL in sample solution))

4 まとめ

稲わら及び WCRS 中に残留するベンフラカルブ及びカルボスルファンについて、厚生労働省通知試験法を基に、LC-MS/MS による定量法の飼料分析基準への収載の可否を検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 操作の簡略化及び試薬の使用量削減のため厚生労働省通知試験法から、ヘキサナー酢酸エチル (7+3) で 1 回液液分配を行い、ヘキサナー酢酸エチル層を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に直接負荷し精製する方法に変更した。
- 2) 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、選択性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、試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。

- 4) 稲わらにベンフラカルブ及びカルボスルファンとして各 0.7 mg/kg 相当量, WCRS に原物中に換算して各 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していた.

文 献

- 1) 環境省中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会 (第 78 回) : 水質汚濁に係る農薬登録基準として環境大臣の定める基準の設定に関する資料, 令和 2 年 11 月 17 日 (2020).
- 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) 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).
- 4) 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 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2009).
- 5) 財団法人日本食品分析センター: 平成 23 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 (2011).
- 6) 顯谷 久典, 近藤 勝, 船水 悦子, 荒木 愛, 青山 幸二: 稲わら中のベンフラカルブ及びカルボスルファン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分析法の開発, 飼料研究報告, 47, 62-72 (2022).
- 7) 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, 平成 17 年 1 月 24 日, 食安発第 0124001 号 (2005).

3 飼料中のジクワット及びパラコート 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分析法の開発

伊澤 淳修*¹, 加藤 耕一*¹, 桑原 正良*¹, 塩津 萌々子*², 山上 陽平*², 保田 伊世*²

Development of Simultaneous Determination Method of Diquat and Paraquat in Feed by LC-MS/MS

IZAWA Atsunobu*¹, KATO Koichi*¹, KUWABARA Masayoshi*¹, SHIOTSU Momoko*²,
YAMAGAMI Yohei*² and YASUDA Iyo*²

(*¹ Kobe Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),

*² Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have developed a simultaneous quantitative determination method of the concentration of diquat and paraquat in feed using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Diquat and paraquat were extracted with water and sulfuric acid by heating under reflux, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then purified with two types of solid phase extraction (SPE) columns (Oasis MCX and Oasis MAX, Waters Co.; Milford, MA, USA). Having oxidized these compounds, the sample solution was purified with an SPE column (Oasis HLB, Waters Co.), and injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of diquat and paraquat. LC separation was then carried out on an ODS column (Inertsil ODS-3, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 4 μm, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 0.1 v/v% formic acid solution and methanol as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on formula feed for layers, as well as corn, rye, ryegrass hay, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS). Diquat was added at different levels as following: 0.02 and 0.15 mg/kg for formula feed for layers; 0.02 and 0.1 mg/kg for corn; 0.01 and 0.06 mg/kg for rye; 1 and 100 mg/kg for ryegrass hay; 0.01 and 0.05 mg/kg for rice straw; 0.004 and 0.05 mg/kg for WCRS. Paraquat was added at different levels as following: 0.02 and 0.15 mg/kg for formula feed for layers; 0.02 and 0.2 mg/kg for corn; 0.01 and 0.1 mg/kg for rye; 1 and 5 mg/kg for ryegrass hay; 0.01 and 0.3 mg/kg for rice straw; 0.004 and 0.05 mg/kg for WCRS. The resulting mean recoveries ranged from 79.4 % to 108 % for diquat, and 73.4 % to 113 % for paraquat respectively. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 17 % for diquat and paraquat.

Key words: diquat; paraquat; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed

キーワード：ジクワット；パラコート；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

ジクワット及びパラコートは、Imperial Chemical Industries (現 Syngenta) (スイス) により開発

*¹ 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

*² 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

された非選択性接触型のピピリジリウム系除草剤であり、植物の光合成により、ジクワットでは過酸化物が、パラコートでは活性酸素が発生し、植物細胞を破壊することで除草効果を示すと考えられている^{1),2)}。

ジクワットは、我が国では 1963 年に初回農薬登録されており、飼料中の基準値³⁾としては、えん麦、小麦及びマイロで 2 mg/kg、大麦で 5 mg/kg、とうもろこしで 0.05 mg/kg、ライ麦で 0.03 mg/kg、牧草で 100 mg/kg が設定されている。飼料中の管理基準値⁴⁾としては、稲わら及び稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で 0.05 mg/kg が設定されている。海外ではヨーロッパ、アジア等、数多くの国で登録されており^{1),5)}、ジャガイモ、大豆やとうもろこし等の穀類や果樹等に使用されている⁶⁾。

パラコートは、我が国では 1965 年に初回農薬登録されており、飼料中の基準値³⁾としては、えん麦及びマイロで 0.5 mg/kg、大麦、小麦及びライ麦で 0.05 mg/kg、とうもろこしで 0.1 mg/kg、牧草で 5 mg/kg と設定されている。飼料中の管理基準値⁴⁾としては、稲わらで 0.3 mg/kg、WCRS で 0.05 mg/kg と設定されている。海外では、アメリカ、カナダ、オーストラリア、南米等で登録^{7),8)}されており、大豆、とうもろこし等の穀類や果樹、牧草等に使用されている^{6),8),9)}。

飼料中のジクワット及びパラコートの分析法としては、飼料分析基準¹⁰⁾において液体クロマトグラフによる個別分析法が記載されているが、定量下限と基準値が一致するものがあり、また、発がんのおそれがあるクロロホルムを使用することから、分析法の改良が急務となっている。

そこで、一般財団法人日本食品分析センターが「平成 28 年度飼料中の農薬分析法開発委託事業」において開発した飼料中のジクワット及びパラコート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¹¹⁾（以下「JFRL 法」という。）について、飼料分析基準への記載の可否を検討することとした。令和 3 年度の検討では検量線、マトリックス効果及び妨害物質の確認、ガラス器具への残留除去方法等の検討を行った¹²⁾。令和 4 年度は引き続き添加回収試験、定量下限及び検出下限の確認を実施したので、その概要を報告する。

なお、飼料分析基準では、単にジクワットと記載した場合はジクワット二臭化物を、またパラコートと記載した場合はパラコート二塩化物を指すと規定されていることから、本検討内でもジクワット又はパラコートと記載した場合には同様の扱いとした。

参考にジクワット及びパラコートの構造式等を Fig. 1 に示した。

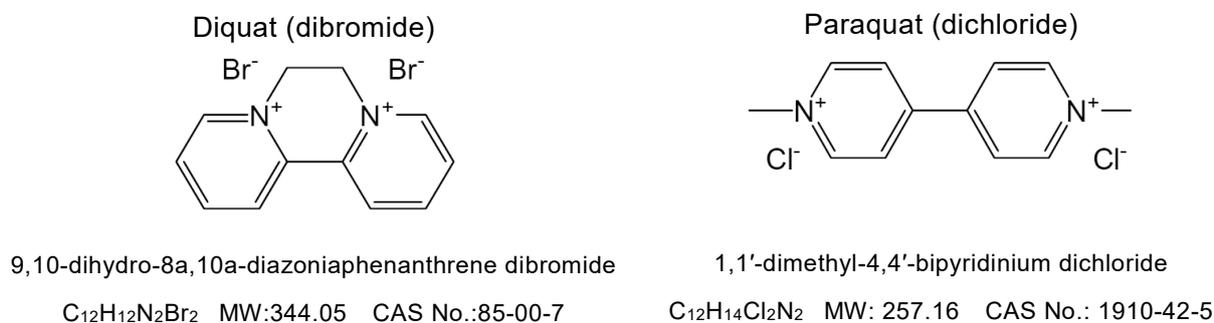


Fig. 1 Chemical structures of diquat and paraquat

2 実験方法

2.1 試料

成鶏飼育用配合飼料，とうもろこし，乾牧草（ライグラス乾草）及び稲わらはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し，分析用試料とした．WCRS は 60 °C で 10 時間乾燥し，更に室内に静置して風乾した後，同様に粉碎し分析用試料とした．市販のライ麦（食用全粒粉細挽き）は 1 mm 網ふるいを通過したものを分析用試料とした．

なお，検討に用いた配合飼料を Table 1 に示した．

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed type	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layers	Grains	54	Corn
	Oil seed meal	25	Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal, corn germ meal
	Animal by-products	2	Fish meal
	Brans	1	Rice bran
	Others	18	Calcium carbonate, animal fat, food by-products, corn steep liquor, calcium phosphate, salt, paprika extract, feed additives

2.2 試薬

1) アセトニトリルは残留農薬・PCB 試験用を用いた．メタノールは残留農薬・PCB 試験用（LC-MS/MS の溶離液のみ LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製））を用いた．ギ酸は LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）を用いた．塩化アンモニウム，塩酸，水酸化ナトリウム，フェリシアン化カリウム及び硫酸は試薬特級を用いた．水は Milli-Q Integral 5（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) ジクワット標準原液

二臭化ジクワット一水和物標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 99.0 %）26.31 mg を量って 50 mL の全量フラスコに入れ，塩酸（0.01 mol/L）を加えて溶かし，更に標線まで塩酸（0.01 mol/L）を加えてジクワット標準原液を調製した（この液 1 mL は，ジクワットとして 0.5 mg を含有）．

3) パラコート標準原液

パラコートジクロリド標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 98.0 %）25 mg を量って 50 mL の全量フラスコに入れ，塩酸（0.01 mol/L）を加えて溶かし，更に標線まで塩酸（0.01 mol/L）を加えてパラコート標準原液を調製した（この液 1 mL は，パラコートとして 0.5 mg を含有）．

4) 混合標準原液

ジクワット標準原液 1 mL 及びパラコート標準原液 1 mL を 25 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し，更に標線まで塩酸（0.01 mol/L）を加えて混合標準原液を調製した（この液 1 mL は，ジクワット及びパラコートとして各 20 µg を含有）．

2.3 装置及び器具

1) 粉碎機 :

粉碎機 1 (成鶏飼育用配合飼料, とうもろこし用) :

ZM 200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)

粉碎機 2 (乾牧草, 稲わら及び WCRS 用) :

SM 100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1430 rpm)

2) 4 級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (以下「MAX ミニカラム」という.) : Oasis MAX (充てん剤量 500 mg, リザーバー容量 6 mL) Waters 製

3) スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (以下「MCX ミニカラム」という.) : Oasis MCX (充てん剤量 500 mg, リザーバー容量 6 mL) Waters 製

4) ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (以下「HLB ミニカラム」という.) : Oasis HLB (充てん剤量 60 mg, リザーバー容量 20 mL) Waters 製

5) メンブランフィルター : 13HP045AN (孔径 0.45 μm , 直径 13 mm, ポリテトラフルオロエチレン) 東洋濾紙製

6) 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 g を量って 300 mL のなす形フラスコに入れ, 水 60 mL 及び硫酸 30 mL を加え, 空冷管を付け 120 °C の油浴で 60 分間加熱還流して抽出した. 200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き, 放冷後の抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後, 先のなす形フラスコ及び残さを順次水 100 mL で洗浄し, 同様に吸引ろ過した. さらに, 全量フラスコの標線まで水を加えた. この液 2 mL (乾牧草は, 更に硫酸 (3 mol/L) で正確に 25 倍希釈した後, その液 2 mL) をポリプロピレン製ビーカーに正確に分取し, 水 30 mL を加え, 水酸化ナトリウム溶液 (12 mol/L) で pH 5.5~6.5 に調整した後, 50 mL 程度となるよう水を加え, カラム処理 I に供する試料溶液とした.

2) カラム処理 I

MAX 及び MCX ミニカラムをそれぞれメタノール 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄し, MAX ミニカラムの上にリザーバー (容量 30 mL) を取り付け, MAX ミニカラムの下に MCX ミニカラムを連結した. 試料溶液をリザーバーに入れ, 液面が充てん剤の上端に達するまで流下 (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.) した. 試料溶液の入っていたポリプロピレン製ビーカーを水 5 mL ずつで 2 回洗浄し, 洗液を順次連結ミニカラムに加え, 同様に流出させた.

MAX ミニカラムをはずし, 10 mL ポリプロピレン製全量フラスコを MCX ミニカラムの下に置き, 塩化アンモニウム溶液 (25 w/v%) 9 mL を MCX ミニカラムに加え, ジクワット及びパラコートを溶出させた. さらに標線まで塩化アンモニウム溶液 (25 w/v%) を加え, 酸化に供

する試料溶液とした。

3) 酸化

試料溶液 2 mL を、あらかじめ水酸化ナトリウム溶液 (12 mol/L) 10 mL 及びフェリシアン化カリウム溶液 (1 w/v%) 1 mL を入れ混合したポリプロピレン製ビーカーに、正確に加えて均質になるよう振り混ぜ、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

4) カラム処理 II

HLB ミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄した。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。試料溶液の入っていたポリプロピレン製ビーカーを水 10 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。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル 5 mL をミニカラムに加え、ジクワット及びパラコートを出させた。

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。水-メタノール (4+1) 1 mL (とうもろこしは 2 mL, 乾牧草は 4 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。

5) 標準液の酸化及びカラム処理

混合標準原液 1 mL を 20 mL の全量フラスコに入れ、標線まで塩酸 (0.01 mol/L) を加えて酸化用混合標準液を調製した (この液 1 mL は、ジクワット及びパラコートとして各 1 µg を含有)。塩化アンモニウム溶液 (25 w/v%) 2 mL に酸化用混合標準液 0.1 mL を正確に加えたものを、あらかじめ水酸化ナトリウム溶液 (12 mol/L) 10 mL 及びフェリシアン化カリウム溶液 (1 w/v%) 1 mL を入れ混合したポリプロピレン製ビーカーに加えた。以下 3) 及び 4) の操作を試料溶液と同様に行った後、水-メタノール (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中にジクワット及びパラコートとして 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 及び 20 ng 相当量を含有する混合標準液を調製した。

6) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び混合標準液各 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 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 4 µm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% formic acid aqueous solution – methanol (4:1) → 10 min → (3:7) (hold for 2 min) → 5 min → (4:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI) (Positive ion mode)
Nebulizer gas	Air (3 L/min)
Drying gas	N ₂ (15 L/min)
Interface temperature	300 °C
Heat block temperature	500 °C
Desolvation line temperature	100 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

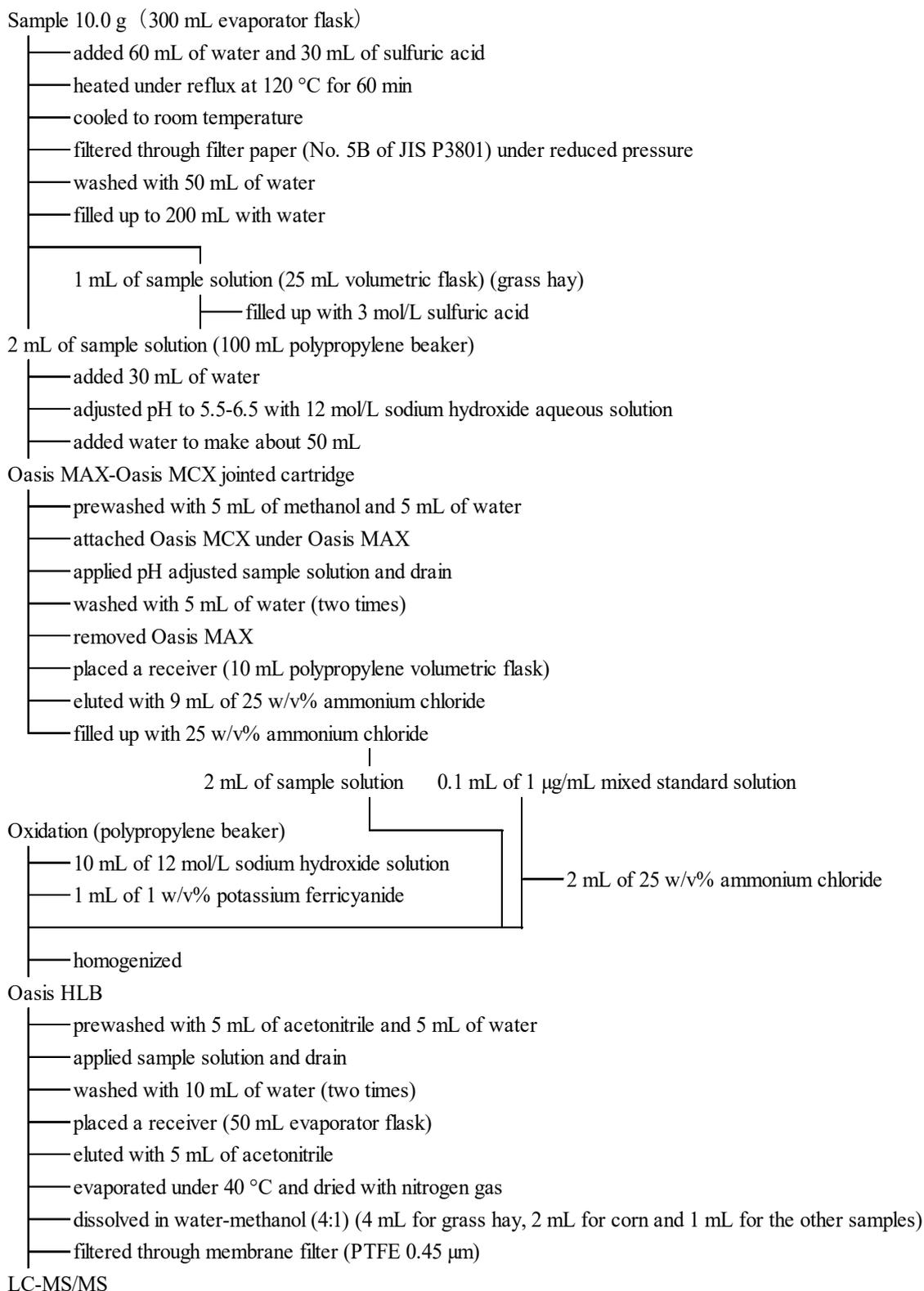
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
Diquat oxide	215	171	—	25
		—	153	10
Paraquat oxide	217	174	—	31
		—	104	45

7) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のジクワット量及びパラコート量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for diquat and paraquat in feed

2.5 ガラス器具の洗浄方法

ジクワット及びパラコートはガラス器具に残留しやすい¹¹⁾ため、使用するガラス器具は全て次の処理を行ったものを用いた。

- 1) 2.4 の 1)で抽出に用いた 300 mL なす形フラスコは、水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) による漬け置き洗浄 (約 15 分間) した後、洗剤や超音波による洗浄を行った。
- 2) 1)の処理を行ったなす形フラスコを含め使用する全てのガラス器具について硝酸 (1+10) による漬け置き洗浄 (一夜) を行った。

2.6 添加回収試験

2.2 の 2)及び 3)のジクワット標準原液及びパラコート標準原液を塩酸 (0.01 mol/L) で正確に希釈し添加に用いた。

ジクワットとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.02 及び 0.15 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.4 及び 3 ng/mL) , とうもろこしに 0.02 及び 0.1 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 1 ng/mL) , ライ麦に 0.01 及び 0.06 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 1.2 ng/mL) , ライグラス乾草に 1 及び 100 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 20 ng/mL) , 稲わらに 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 1 ng/mL) , WCRS に原物換算して 0.004 及び 0.05 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 2.25 ng/mL) , パラコートとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.02 及び 0.15 mg/kg 相当量 (同 0.4 及び 3 ng/mL) , とうもろこしに 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 2 ng/mL) , ライ麦に 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 2 ng/mL) , ライグラス乾草に 1 及び 5 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 1 ng/mL) , 稲わらに 0.01 及び 0.3 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 6 ng/mL) , WCRS に原物換算して 0.004 及び 0.05 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 2.25 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 2.4 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 への添加は風乾物試料に対してジクワット及びパラコートとして 0.01 及び 0.1125 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、 $\text{原物 (水分含有量 60 \%)} \text{中濃度} = \text{風乾物 (水分含有量 10 \%)} \text{中濃度} / 2.25$ の式により行った。

3 結果及び考察

3.1 妨害物質の検討

2.6 の添加回収試験の対象試料のうち、とうもろこし、ライグラス乾草、稲わら及び WCRS については令和 3 年度に確認済みのため¹¹⁾、未検討であった成鶏飼育用配合飼料及びライ麦について、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。その結果、ジクワット及びパラコートの定量を妨げるピークは認められなかった。なお、成鶏飼育用配合飼料及びライ麦においてジクワット及びパラコートと同じ保持時間にピークが認められたが、ライ麦については飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン (以下「妥当性確認法ガイドライン」という。) に定められた妨害ピークの許容範囲内 (基準値に相当するピーク面積の 1/10 未満) であり、成鶏飼育用配合飼料においても妥当性確認法ガイドラインに定められた妨害ピークの許容範囲内 (基準値が定められていない場合は、定量下限濃度に相当するピーク面積の 1/3 未満) であった。

なお、得られた SRM クロマトグラムを Fig. 2 に示した。

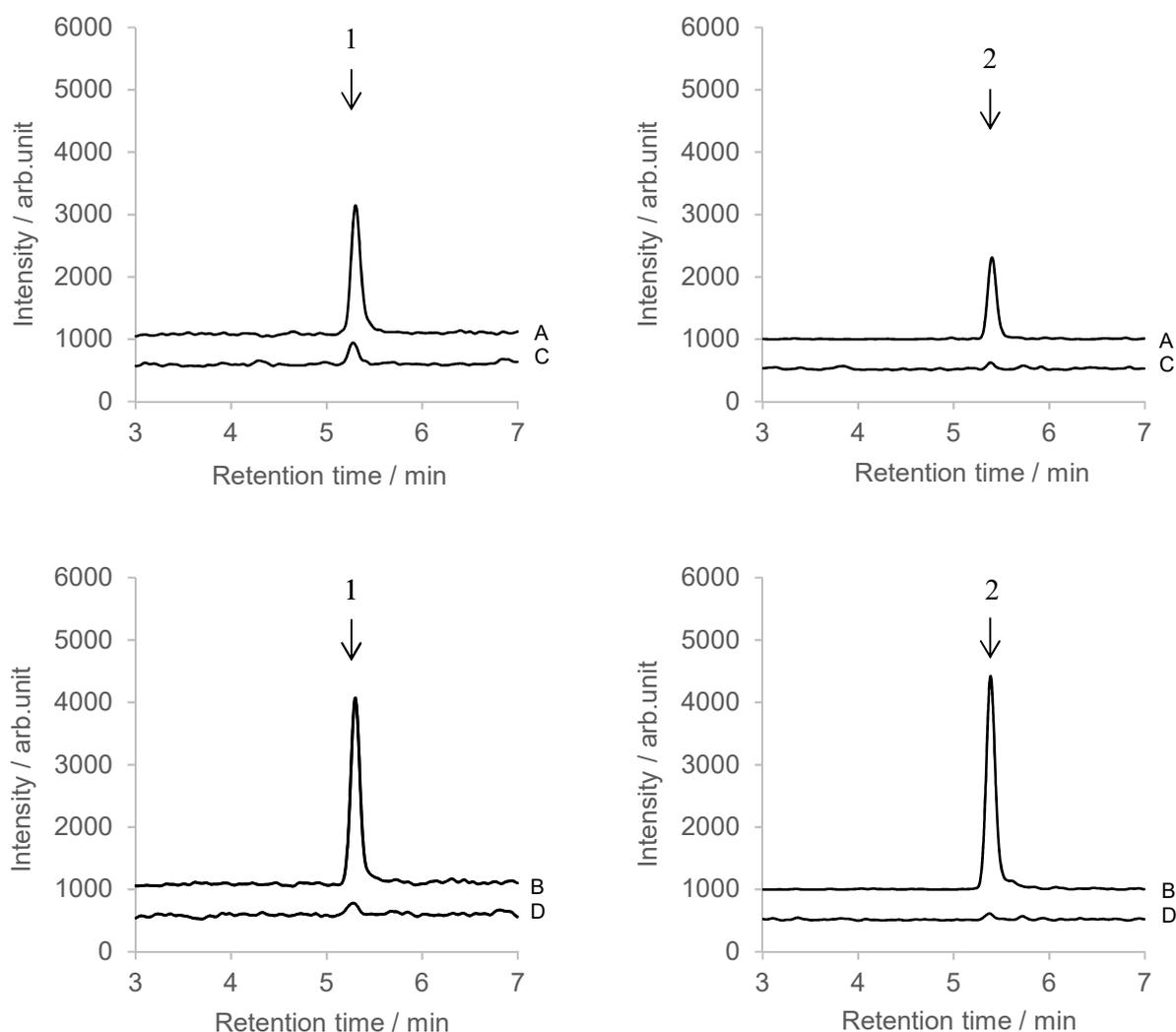


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of diquat oxide and paraquat oxide in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention times of 1: diquat oxide and 2: paraquat oxide. The baselines are shifted for display.)

A, B: Standard solution (A: The oxidative product of 0.4 ng/mL each as diquat and paraquat,

B: The oxidative product of 0.6 ng/mL as diquat and 1 ng/mL as paraquat),

C, D: Blank sample solution (C: Formula feed for layers, D: Rye)

3.2 マトリックス効果の確認

令和3年度に未検討であった成鶏飼育用配合飼料及びライ麦について、マトリックス効果を確認した。2.4の1)から4)により調製した成鶏飼育用配合飼料の blanks 試料溶液に、ジクワット及びパラコートとして0.15 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で3 ng/mL 相当量）を、ライ麦の blanks 試料溶液に、ジクワットとして0.03 mg/kg 相当量（同0.6 ng/mL 相当量）及びパラコートとして0.05 mg/kg 相当量（同1 ng/mL 相当量）を添加した各マトリックス標準液について、2.2の2)から4)及び2.4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。その結果、Table 4のとおり、試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。

Table 4 Matrix effect study

Samples	Concentration				Matrix effect ^{b)} (%)	
	Matrix standard solution (ng/mL)		Sample ^{a)} (mg/kg)		Diquat	Paraquat
	Diquat	Paraquat	Diquat	Paraquat		
Formula feed for layers	3	3	0.15	0.15	100	101
Rye	0.6	1	0.03	0.05	105	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

3.3 添加回収試験

2.6により添加回収試験を実施した。その結果はTable 5のとおり、ジクワットについては平均回収率は79.4~108%，その繰返し精度は相対標準偏差（ RSD_r ）として17%以下、パラコートについては平均回収率は73.4~113%， RSD_r は17%以下の成績が得られ、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（真度：70%以上120%以下，精度：22%以下（添加濃度0.01~0.1125 mg/kg），21%以下（同0.15 mg/kg），20%以下（同0.2 mg/kg），19%以下（同0.3 mg/kg），16%以下（同1 mg/kg），13%以下（同5 mg/kg），8%以下（同100 mg/kg））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. 3に示した。

Table 5 Recoveries for diquat and paraquat

Feed types	Diquat			Paraquat		
	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
Formula feed for layers	0.02	106	17	0.02	88.5	9.7
	0.15	94.7	4.4	0.15	92.3	4.1
Corn	0.02	79.4	4.4	0.02	74.7	15
	0.1	87.4	4.5	0.2	88.4	6.8
Rye	0.01	81.8	12	0.01	85.5	17
	0.06	81.3	6.2	0.1	90.1	5.2
Ryegrass hay	1	93.3	6.8	1	91.5	2.9
	100	86.7	2.4	5	86.2	4.3
Rice straw	0.01	104	6.0	0.01	73.4	7.4
	0.05	102	4.0	0.3	87.0	2.8
WCRS	0.004	108	11	0.004	113	11
	0.05	96.1	4.2	0.05	91.7	4.2

a) The pesticides were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction.

The spiked levels were 0.01 and 0.1125 mg/kg as air-dry basis for each pesticide. The levels of pesticides as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

The levels of pesticides as fed basis (moisture 60 %)

= the levels of pesticides as air-dry basis (moisture 10 %) / 2.25

b) Mean ($n = 6$, except corn ($n = 5$))

c) Relative standard deviation of repeatability

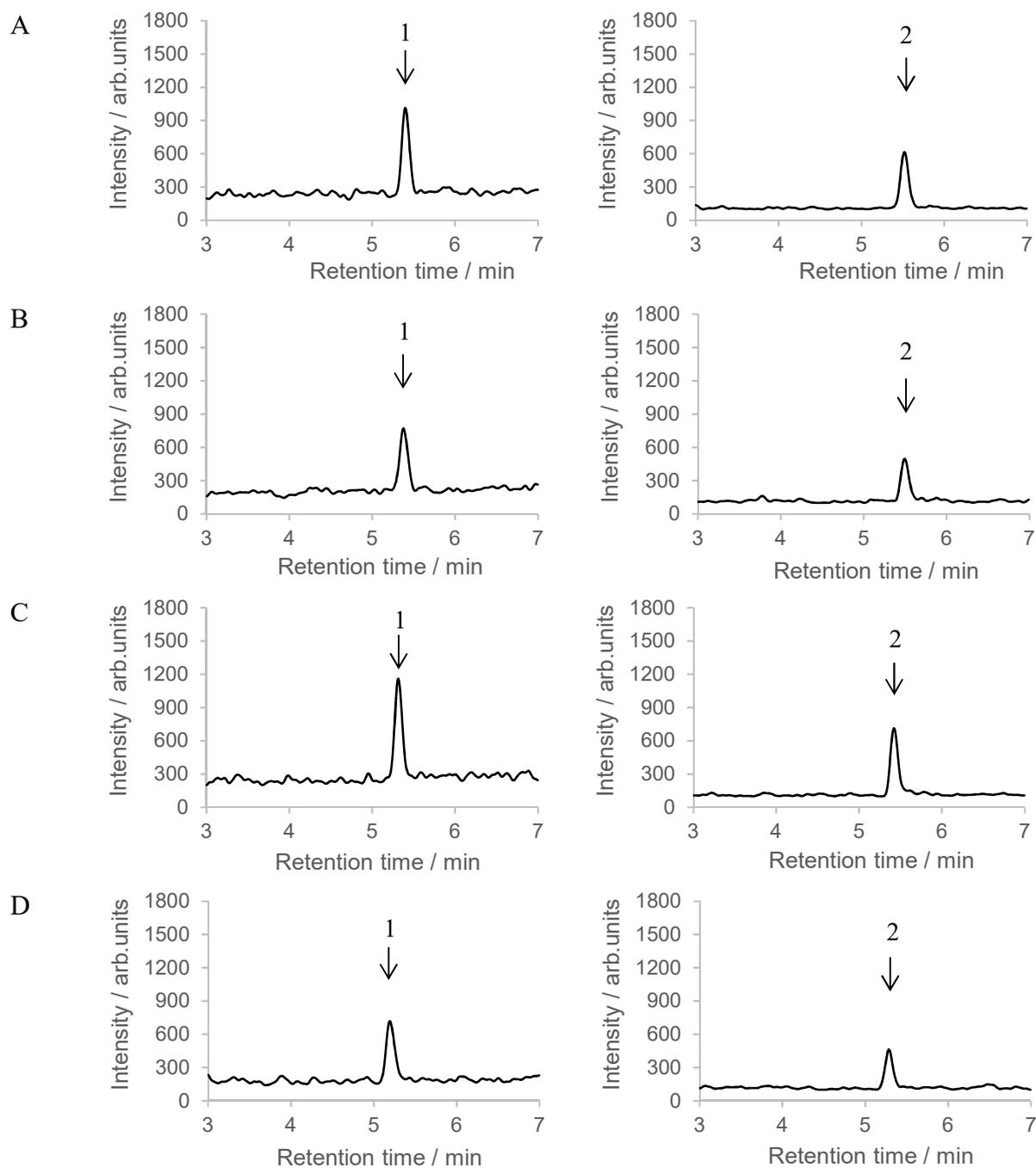


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of diquat oxide and paraquat oxide in standard and spiked sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of 1: diquat oxide and 2: paraquat oxide.)

A: Standard solution (The oxidative product of 0.2 ng/mL: 0.002 ng as each pesticide)

B: Sample solution of corn (spiked at 0.02 mg/kg of each pesticide (as 0.2 ng/mL in sample solution))

C: Sample solution of ryegrass hay (spiked at 1 mg/kg of each pesticide (as 0.2 ng/mL in sample solution))

D: Sample solution of rice straw (spiked at 0.01 mg/kg of each pesticide (as 0.2 ng/mL in sample solution))

3.4 定量下限及び検出下限の検討

ジクワット及びパラコートの検量線が直線性を示した範囲、各 0.1~20 ng/mL の下端付近となる濃度（成鶏飼育用配合飼料で 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 0.4 ng/mL 相当量）、とうもろこしで 0.02 mg/kg 相当量（同 0.2 ng/mL 相当量）、ライ麦、稲わら及び WCRS（風乾物中）で 0.01 mg/kg 相当量（同 0.2 ng/mL 相当量）、ライグラス乾草で 1 mg/kg 相当量（同 0.2 ng/mL 相当量））の添加回収試験の結果は Table 5 のとおり良好であり、得られたピークの SN 比が 10 以上であったため、ジクワット及びパラコートの定量下限の濃度は成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしで 0.02 mg/kg、ライ麦、稲わら及び WCRS（風乾物中）で 0.01 mg/kg、ライグラス乾草で 1 mg/kg とした。この濃度は、ジクワット及びパラコートについてとうもろこしの基準値（それぞれ 0.05 mg/kg 及び 0.1 mg/kg）に対してそれぞれ 2/5 及び 1/5、ライ麦の基準値（それぞれ 0.03 mg/kg 及び 0.05 mg/kg）に対してそれぞれ 1/3 及び 1/5、ライグラス乾草の基準値（それぞれ 100 mg/kg 及び 5 mg/kg）に対してそれぞれ 1/100 及び 1/5、稲わらの管理基準値（それぞれ 0.05 mg/kg 及び 0.3 mg/kg）に対してそれぞれ 1/5 及び 1/30、WCRS 中の管理基準値の風乾物中換算値（0.1125 mg/kg）に対して 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値（基準値 0.1 mg/kg 未満：2/5 以下、基準値 0.1 mg/kg 以上：1/5 以下）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、ジクワット及びパラコートの検出下限は成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしで 0.006 mg/kg、ライ麦、稲わら及び WCRS（風乾物中）で 0.003 mg/kg、ライグラス乾草で 0.3 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値（基準値 0.1 mg/kg 未満：基準値の 1/5 以下、基準値 0.1 mg/kg 以上：基準値の 1/10 以下）を満たしていた。

4 まとめ

飼料中のジクワット及びパラコートについて、JFRL 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収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 成鶏飼育用配合飼料及びライ麦について、本法に従って得られたクロマトグラムには、ジクワット及びパラコートと同じ保持時間にピークが認められたが、妥当性確認法ガイドラインに定められた妨害ピークの許容範囲内であり、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 2) 成鶏飼育用配合飼料及びライ麦について、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、試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。
- 3) ジクワットとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.02 及び 0.15 mg/kg 相当量、とうもろこしに 0.02 及び 0.1 mg/kg 相当量、ライ麦に 0.01 及び 0.06 mg/kg 相当量、ライグラス乾草に 1 及び 100 mg/kg 相当量、稲わらに 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量、WCRS に原物換算して 0.004 及び 0.05 mg/kg 相当量、パラコートとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.02 及び 0.15 mg/kg 相当量、とうもろこしに 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量、ライ麦に 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量、ライグラス乾草に 1 及び 5 mg/kg 相当量、稲わらに 0.01 及び 0.3 mg/kg 相当量、WCRS に原物換算して 0.004 及び 0.05 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って分析を実施し、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結果が得られた。

- 4) 本法のジクワット及びパラコートの定量下限の濃度は成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしで 0.02 mg/kg, ライ麦, 稲わら及び WCRS (風乾物中) で 0.01 mg/kg, ライグラス乾草で 1 mg/kg であり, 検出下限は成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしで 0.006 mg/kg, ライ麦, 稲わら及び WCRS (風乾物中) で 0.003 mg/kg, ライグラス乾草で 0.3 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値を満たしていた.

文 献

- 1) 食品安全委員会：食品健康影響評価の結果の通知について，令和元年 10 月 8 日，府食 368 号 (2019).
- 2) 水域の生活環境動植物の被害防止に係る農薬登録基準：評価書（水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料 パラコートジクロリド（パラコート））
- 3) 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，農林省令第 35 号，昭和 51 年 7 月 24 日 (1976).
- 4) 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).
- 5) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：農薬抄録
<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/diquat-dibromide/index.htm>, cited 27 Dec. 2022.
- 6) United States Department of Agriculture, National agricultural statistics service : Agricultural chemical use program https://www.nass.usda.gov/Surveys/Guide_to_NASS_Surveys/Chemical_Use/, cited 27 Dec. 2022.
- 7) 食品安全委員会：食品健康影響評価の結果の通知について，令和 4 年 6 月 28 日，府食 338 号 (2022).
- 8) United States Environmental Protection Agency, Pesticide registration : <https://www.epa.gov/pesticide-registration>, cited 27 Dec. 2022.
- 9) SUMITOMO CHEMICAL Latin America : <https://www.sumitomochemical.com/asd/ar/herbicides-argentina/paraquat/>, cited 27 Dec. 2022.
- 10) 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).
- 11) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 28 年度飼料中の農薬分析法開発委託事業報告書，平成 29 年 3 月 (2017).
- 12) 榎原 良成，伊澤 淳修，桑原 正良，高橋 雄一，保田 伊世，青山 幸二：飼料中のジクワット及びパラコートの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発，飼料研究報告，47，33-45 (2022).

4 豚用配合飼料中のシスチン，リジン，メチオニン及びトレオニンのアミノ酸自動分析装置による分析法の検討

土井 雄悟*，山上 陽平*

Study of Determination Method of Cystine, Lysine, Methionine and Threonine in Formula Feed for Pigs by Automatic Amino Acid Analyzer

DOI Yugo* and YAMAGAMI Yohei*

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

We have researched a determination method of amino acids (cystine, lysine, methionine and threonine) in formula feed generally used by feed-related companies. Based on the research results, we have further conducted preliminary study to develop a determination method of methionine in formula feed for pigs.

In the performic acid oxidation method, methionine sulfone was quantified as following: Methionine in a sample was oxidized to methionine sulfone with performic acid solution. The sample solution was hydrolyzed with hydrochloric acid. The sample solution was then concentrated under the reduced pressure, and diluted with sodium citrate buffer. Then, methionine sulfone in the sample solution was determined by an automatic amino acid analyzer. In the hydrobromic acid addition method, methionine sulfone was quantified as following: Methionine in a sample was oxidized to methionine sulfone with performic acid solution. The sample solution was added with hydrobromic acid to decompose performic acid. After that, methionine sulfone in the sample solution was determined by the same preparation as performic acid oxidation method. In the simultaneous analysis method, methionine in a sample was pretreated according to the simultaneous amino acid analysis method, listed in the Feed Analysis Standard of Japan.

Consequently, the performic acid oxidation method resulted in the higher measured value of methionine compared to the simultaneous analysis method. On the other hand, the hydrobromic acid addition method did not bring about the higher measured value of methionine compared to the performic acid oxidation method.

Key words: amino acid; cysteine; lysine; methionine; methionine sulfone; threonine; automatic amino acid analyzer; formula feed for pigs

キーワード：アミノ酸；シスチン；リジン；メチオニン；メチオニンスルホン；トレオニン；アミノ酸自動分析装置；豚用配合飼料

1 緒 言

家畜排せつ物に含まれる窒素及びリンは、地球温暖化や悪臭の発生などの畜産環境問題の原因として問題となっているが、このうち排せつ物中の窒素については、アミノ酸バランスの適正化により低減できることが報告されている¹⁾。これらの知見に基づき、飼料の公定規格²⁾には環境負荷低減型配合飼料（豚用）の規格が設けられ、アミノ酸（トレオニン，メチオニン及びシスチン並びにリジン）の最小量が規定されている。また、農林水産省が令和3年に策定した「みどりの食料シス

* 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

テム戦略」に掲げている畜産分野における温室効果ガス排出量の削減に向けても³⁾，環境負荷低減型配合飼料の普及が期待されている。

現在，飼料中のメチオニンの分析法について飼料分析基準⁴⁾ではアミノ酸分析計による同時分析法（以下「同時分析法」という．）が記載されているが，低回収の問題がある．また，シスチン，リジン及びトレオニンについても豚用配合飼料において妥当性を確認する必要がある．そこで，まず適切な分析法を決定するため，アミノ酸分析を行っている飼料関係業者等を対象に実態調査を行った結果，飼料関係業者の間では配合飼料中のメチオニンを過ギ酸処理によりメチオニンスルホンに酸化した後，塩酸加水分解を行い，アミノ酸自動分析装置で測定する方法（以下「過ギ酸酸化処理法」という．）が一般的に用いられていることが判明した．

また，日本標準飼料成分表⁵⁾では飼料中のシスチン及びメチオニン測定法として，過ギ酸処理後，臭化水素酸溶液を添加することで，未反応の過ギ酸を分解し過剰な酸化を防ぐ方法（以下「臭化水素酸添加法」という．）が記載されている．

そこで今回，飼料添加物としてメチオニンを含む豚用配合飼料について，同時分析法，過ギ酸酸化処理法及び臭化水素酸添加法でメチオニンを測定し，測定値を比較するための予備検討を行ったのでその概要を報告する．

参考にメチオニン及びメチオニンスルホンの構造式を Fig. 1 に示した．

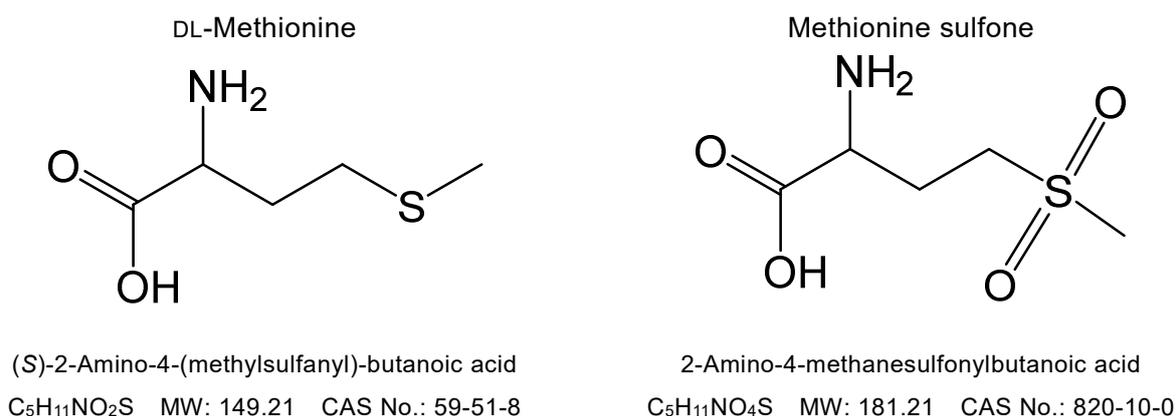


Fig. 1 Chemical structures of methionine and methionine sulfone

2 実験方法

2.1 試料

ほ乳期子豚育成用配合飼料，子豚育成用配合飼料及び肉豚肥育用配合飼料はそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し，分析用試料とした．検討に用いた配合飼料の原材料については Table 1 に示した．

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For suckling pigs	Grains	58	Corn, heat-treated corn, heat-treated soybean
	Oil seed meal	18	Soybean meal, linseed meal
	Animal by-products	6	Dried whey, fish meal, skim milk, swine and poultry by-product meal
	Others	18	Confection, calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, fructooligosaccharide, silic acid, cultured <i>paenibacillus</i> , yeast for feed, citric acid, tartaric acid, lactic acid, malic acid, sepiolite, feed additives
For growing pigs	Grains	75	Corn, wheat, rice, milo
	Oil seed meal	21	Soybean meal, rapeseed meal
	Brans	1	Wheat bran, distiller's dried grains with solubles
	Others	3	Animal fat, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, licorice root extract, stevia, feed additives
For pork pigs	Grains	73	Milo, wheat, rice, cassava, barley, heat-treated milo
	Brans	7	Rice bran, corn gluten feed, wheat bran
	Oil seed meal	6	Soybean meal, rapeseed meal, wheat bran
	Others	14	Confection, calcium carbonate, molasses, calcium phosphate, salt, bakery yeast, feed additives

2.2 試薬

1) 水酸化ナトリウム、塩酸、ギ酸（質量分率 98 %）及び臭化水素酸は試薬特級を用いた。pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液は試料希釈用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。過酸化水素水は Ultrapur（関東化学製、純度 30~32 %）を用いた。シリコン油は SRX 310（東レ・ダウコーニング製）を用いた。水は Milli-Q Integral 5（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) 標準液

i 同時分析法

L-メチオニン標準品（富士フィルム和光純薬製、純度 99.0 %）30 mg を量って 100 mL の全量フラスコに入れ、pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液を加えて溶かし、更に標線まで pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液を加えてメチオニン標準原液を調製した（この液 1 mL は、メチオニンとして 0.3 mg を含有）。

使用に際して、メチオニン標準原液 1 mL 及び 2 mL をそれぞれ 25 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液を加えて、1 mL 中にメチオニンとして 12 µg 及び 24 µg を含有するメチオニン標準液 1 及び 2 を調製した。

ii 過ギ酸酸化処理法及び臭化水素酸添加法

L-メチオニン標準品 30 mg を量って 100 mL の全量フラスコに入れ、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて溶かし、更に標線まで 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えてメチオニンスルホン用標準原液を調製した（この液 1 mL は、メチオニンとして 0.3 mg を含有）。

使用に際して、メチオニンスルホン用標準原液 1 mL 及び 2 mL をそれぞれ 50 mL なす形フラスコに正確に入れ、以降は 2.4 の 2)と同様の操作を行い、1 mL 中にメチオニンとして 12 µg 及び 24 µg を含有するメチオニンスルホン標準液 1 及び 2 を調製した。

3) 過酸化水素水・ギ酸溶液

過酸化水素水 50 mL にギ酸 450 mL を加えた後，1 時間静置して調製した。

4) 溶離液及び反応液

アミノ酸自動分析装置で使用する溶離液は Amino Buffer Na-LG 1st, 2nd, 3rd 及び 4th (日本分光製，以下「1st」，「2nd」，「3rd」及び「4th」とする。) を使用した。反応液は Amino Reagent Na-LG (Hypo Reagent) (日本分光製) 並びに Amino Reagent Na-LG (OPA Reagent) (日本分光製) 1000 mL に，エタノール (日本分光製，純度 99.5 %) 10 mL で溶かしたオルトフタルアルデヒド (日本分光製，純度 99.0 %) 500 mg を加えて調製した OPA 反応液を使用した。溶離液の組成については Table 2 に，反応液の組成については Table 3 に示した。

Table 2 Compositions of the mobile phase

Mobile phase name	Manufacturer	Substance name	Proportion (%)
Amino Buffer Na-LG 1st	JASCO Corporation	Ultrapure water	< 80
		Ethanol	15
		Citric acid monohydrate	< 5
		Trisodium citrate dihydrate	< 1
		Sodium perchlorate dihydrate	< 1
Amino Buffer Na-LG 2nd	JASCO Corporation	Ultrapure water	< 90
		Citric acid monohydrate	< 5
		Trisodium citrate dihydrate	< 1
		Sodium perchlorate dihydrate	< 1
Amino Buffer Na-LG 3rd	JASCO Corporation	Ultrapure water	< 95
		Citric acid monohydrate	< 1
		Trisodium citrate dihydrate	< 1
		Sodium perchlorate dihydrate	< 1
Amino Buffer Na-LG 4th	JASCO Corporation	Ultrapure water	> 98
		Sodium hydroxide	< 1

Table 3 Compositions of the reagent

Reagent name	Manufacturer	Substance name	Proportion (%)
Amino Reagent Na-LG (HYPO Reagent)	JASCO Corporation	Ultrapure water	> 95
		Boric acid	< 2
		Sodium hydroxide	< 1
		sodium hypochlorite	< 0.1
Amino Reagent Na-LG (OPA Reagent)	JASCO Corporation	Ultrapure water	> 95
		Boric acid	< 2
		Sodium hydroxide	< 1
		Brij-35, 30 % Solution	< 0.5
		3-mercaptopropionic acid	< 0.5

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM 200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) アミノ酸自動分析装置：EXTREMA 日本分光製

2.4 定量方法

1) 同時分析法

i 加水分解

各分析試料を粗たん白質として 10 mg 相当量（ほ乳期子豚育成用配合飼料 57 mg，子豚育成用配合飼料 66 mg，肉豚肥育用配合飼料 83 mg）を量って加水分解管に入れ，6 mol/L 塩酸を 5 mL 加え，冷却しながら十分に脱気し，窒素ガスを充填した．加水分解管を密栓してヒートブロックに入れ，110 °C で 20 時間加熱して分解した後放冷した．

分解液を水で 50 mL のなす形フラスコに移し，50 °C の水浴で減圧濃縮し，水 10 mL を加え，同様に減圧濃縮して塩酸を揮散させた．この液を pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液で 25 mL の全量フラスコに移し，更に標線まで pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液を加え，ろ紙（5 種 A）でろ過し，アミノ酸自動分析装置に供する試料溶液とした．

ii アミノ酸自動分析装置による測定

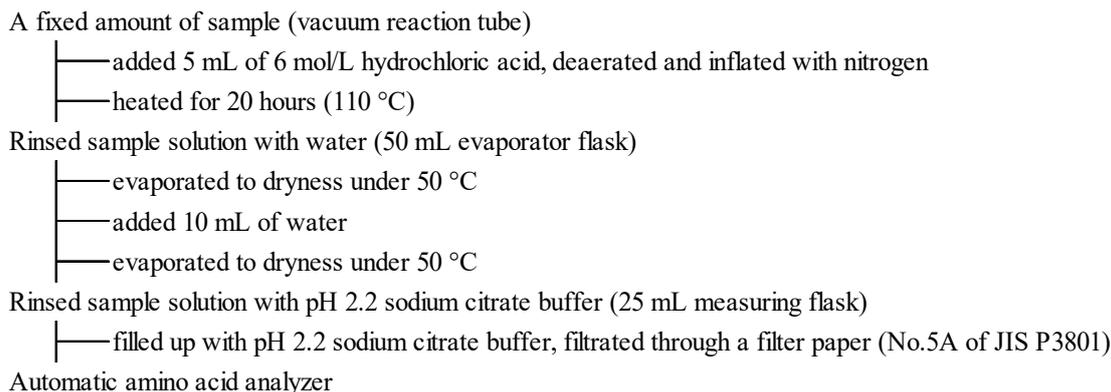
試料溶液，メチオニン標準液 1 及び 2 各 10 μ L をアミノ酸自動分析装置に注入し，クロマトグラムを得た．測定条件を Table 4 に示した．

Table 4 Operation conditions of automatic amino acid analyzer

Detector	Fluorescent detector (excitation wavelength: 345 nm, fluorescent wavelength: 455 nm)
Separation column	AApak Na-LG (6.0 mm i.d. \times 50 mm, 4 μ m), JASCO
Ammonia removal column	AECpak Na-LG (4.6 mm i.d. \times 35 mm), JASCO
Mobile phase	1st (hold for 1.5 min) \rightarrow 0.5 min \rightarrow 1st-2nd-3rd (44+5+1) \rightarrow 1 min \rightarrow 2nd-3rd (24+1) \rightarrow 4 min \rightarrow 2nd-3rd (22+3) \rightarrow 8 min \rightarrow 2nd-3rd (41+9) \rightarrow 10 min \rightarrow 2nd-3rd (1+1) \rightarrow 5 min \rightarrow 2nd-3rd (1+4) \rightarrow 5 min \rightarrow 3rd (hold for 5 min) \rightarrow 0.1 min \rightarrow 4th (hold for 0.9 min) \rightarrow 0.5 min \rightarrow 1st (hold for 18.5 min)
Flow rate	Mobile phase: 0.5 mL/min, Reagent: 0.5 mL
Column temperature	60 °C

iii 計算

得られたクロマトグラムからピーク高さを求め，試料中のメチオニン量を算出した．なお，定量法の概要を Scheme 1 に示した．



Scheme 1 Analytical procedure for methionine assay in feed
(simultaneous analysis method)

2) 過ギ酸酸化処理法

i 過ギ酸酸化

各分析試料を粗たん白質として 10 mg 相当量（ほ乳期子豚育成用配合飼料 57 mg，子豚育成用配合飼料 66 mg，肉豚肥育用配合飼料 83 mg）となるように量って 50 mL のなす形フラスコに入れ，過酸化水素水—ギ酸溶液（1+9）10 mL を加えて密栓し，冷所（0~4 °C）に一夜静置した．これに消泡剤としてシリコン油 1~2 滴を加え，ほとんど乾固するまで 50 °C の水浴で減圧濃縮した後放冷した．

ii 加水分解

先のなす形フラスコに 6 mol/L 塩酸 25 mL を加え，冷却管を付けた栓をし，135 °C のシリコン油浴中で 20 時間加熱して分解した後放冷した．分解液を 50 °C の水浴で減圧濃縮し，水 10 mL を加え，同様に減圧濃縮して塩酸を揮散させた．この液を pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液で 25 mL の全量フラスコに移し，更に標線まで pH 2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液を加え，ろ紙（5 種 A）でろ過し，アミノ酸自動分析装置に供する試料溶液とした．

iii アミノ酸自動分析装置による測定

試料溶液，メチオニンスルホン標準液 1 及び 2 各 10 µL をアミノ酸自動分析装置に注入し，クロマトグラムを得た．測定条件は 2.4 の 1) の ii のとおり．

iv 計 算

得られたクロマトグラムからピーク高さを求め，メチオニンスルホン標準液のピーク高さを基準に試料中のメチオニン量を算出した．

3) 臭化水素酸添加法

各分析試料を粗たん白質として 10 mg 相当量（ほ乳期子豚育成用配合飼料 57 mg，子豚育成用配合飼料 66 mg，肉豚肥育用配合飼料 83 mg）を量って 50 mL のなす形フラスコに入れ，過酸化水素水—ギ酸溶液（1+9）10 mL を加えて密栓し，冷所（0~4 °C）に一夜静置した．その後臭化水素酸溶液 1.6 mL を加え，30 分間氷上で静置した．これに消泡剤としてシリコン油 1~2 滴を加え，ほとんど乾固するまで 50 °C の水浴で減圧濃縮した後放冷した．以下，2.4 の 2) の ii から iv に従った．

なお，定量法の概要を Scheme 2 に示した．

- A fixed amount of sample (50 mL evaporator flask)
- added 10 mL of hydrogen peroxide-formic acid (1:9), plugged evaporator flask
 - left overnight (0~4 °C)
 - added 1.6 mL hydrobromic acid, left in ice bath for 30 min (only hydrobromic acid addition method)
 - added a few drops of silicone oil, evaporated to dryness under 50 °C
 - added 25 mL of 6 mol/L hydrochloric acid, plugged evaporator flask with cooling tube
 - heated for 20 hours in oil bath (135 °C)
 - evaporated to dryness under 50 °C
 - added 10 mL of water
 - evaporated to dryness under 50 °C
- Rinsed sample solution with pH 2.2 sodium citrate buffer (25 mL measuring flask)
- filled up with pH 2.2 sodium citrate buffer, filtered through a filter paper (No.5A of JIS P3801)
- Automatic amino acid analyzer

Scheme 2 Analytical procedure for methionine assay in feed
(performic acid oxidation method and hydrobromic acid addition method)

3 結果及び考察

3.1 配合飼料中のアミノ酸分析についての実態調査結果

アミノ酸分析を行っている飼料関係業者等を対象に実態調査を行った。その結果、飼料関係業者 14 試験室及び登録検定機関 2 試験室の計 16 試験室から、配合飼料中のアミノ酸の分析（もしくは委託による品質管理）を行っていることが回答があった。当該 16 試験室に対して試料の前処理の方法を確認したところ、11 試験室がリジン及びトレオニンについては塩酸加水分解のみを行い、シスチン及びメチオニンについては過ギ酸酸化後に塩酸加水分解を行っていた。また、測定機器についてはアミノ酸自動分析装置を使用する試験室が 12 試験室であった。以上の結果から、飼料関係業者の間では配合飼料中のメチオニンを過ギ酸処理によりメチオニンスルホンに酸化した後、塩酸加水分解を行い、アミノ酸自動分析装置で測定する方法が一般的に用いられていることが判明した。

3.2 各分析法による測定値

2.4 に従って、各配合飼料について同時分析法によりメチオニン、過ギ酸酸化処理法と臭化水素酸添加法によりメチオニンスルホンを測定したところ、Fig. 2 及び Fig. 3 に示したクロマトグラムが得られ、ピークの高さからメチオニン量を算出したところ、Table 5 の結果が得られた。メチオニンスルホンのピークについては、妨害ピークと重なっており、分離度は 0.8 程度であったため、定量が困難であった。そこでピークが正規分布していると仮定し、推定される妨害ピークの割合を求めたところ、7~10 %程度の割合で重なっていた。なお、分離度は以下の式により算出した。

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_1 + W_2)/2} = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{1/2, 1} + W_{1/2, 2}}$$

t_{R1} : 前のピークの保持時間

t_{R2} : 後ろのピークの保持時間

W_1 : 前のピークのピーク幅

W_2 : 後ろのピークのピーク幅

$W_{1/2,1}$: 前のピークの半値幅 $W_{1/2,2}$: 後ろのピークの半値幅

重なっているピークの高さを差し引いても，同時分析法と比較して過ギ酸酸化処理法の方がメチオニンの測定値が 1.4~1.7 倍程度高かった．一方，今回の結果において過ギ酸処理後の臭化水素酸の添加によりメチオニンの測定値が増加する傾向は特に確認できなかった．

Table 5 Measurement result of methionine

Formula feed types	Methionine (%)		
	Simultaneous analysis method	Performic acid oxidation method	Hydrobromic acid addition method
For suckling pigs	-	0.512	0.529
For growing pigs	0.203	0.325	0.308
For pork pigs	0.188	0.352	0.323

$n = 1$

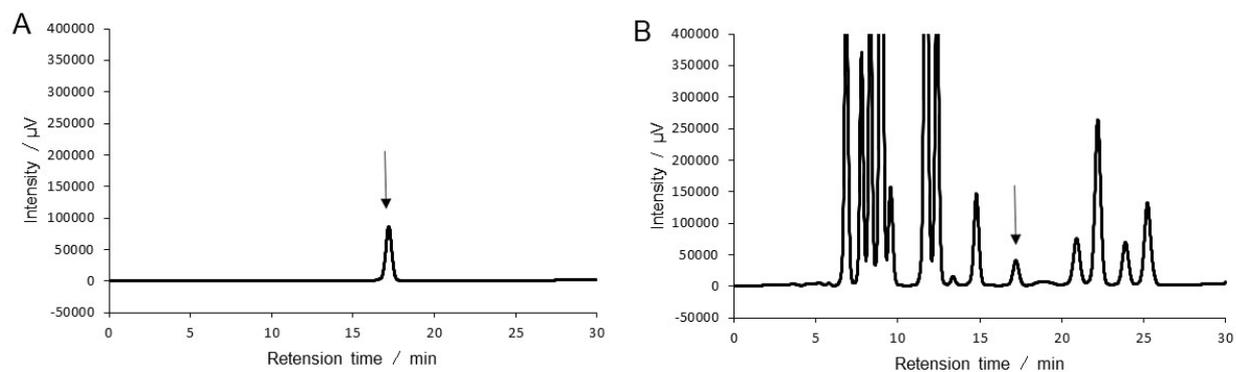


Fig. 2 Typical chromatograms of methionine in standard and sample solution (Operating conditions of automatic amino acid analyzer are shown in Table 4. Arrows indicate the peaks of methionine.)

A: Standard solution 1 (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 120 ng as methionine)

B: Sample solution of formula feed for growing pigs (Simultaneous analysis method)

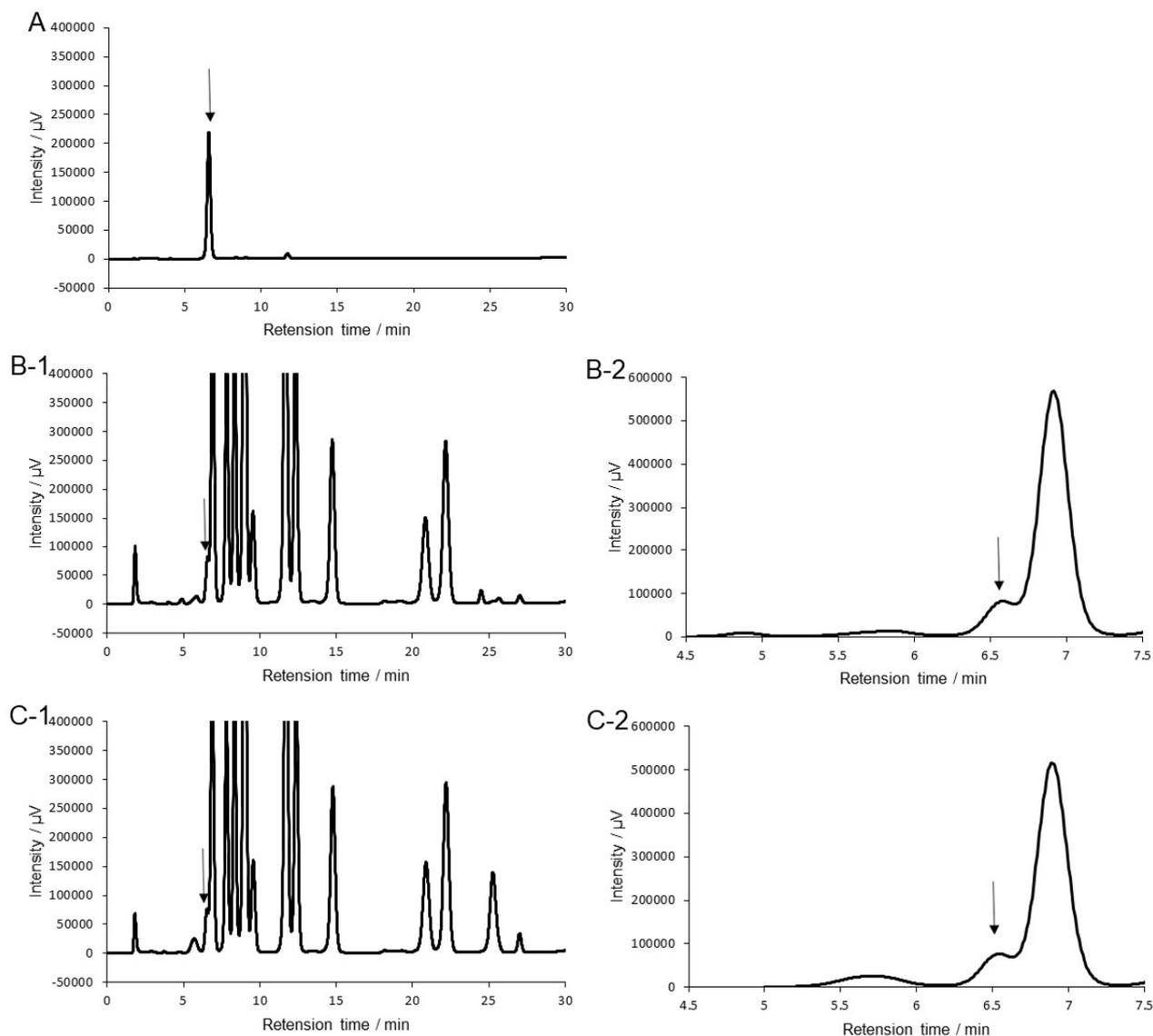


Fig. 3 Typical chromatograms of methionine sulfone in standard and sample solution (Operating conditions of automatic amino acid analyzer are shown in Table 4. Arrows indicate the peaks of methionine sulfone.)

A: Standard solution 2 (24 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 240 ng as methionine)

B-1, 2: Sample solution of formula feed for growing pigs (performic acid oxidation method, B-2 is an enlarged view of a portion of B-1 along the horizontal axis.)

C-1, 2: Sample solution of formula feed for growing pigs (hydrobromic acid addition method, C-2 is an enlarged view of a portion of C-1 along the horizontal axis.)

4 まとめ

豚用配合飼料中のメチオニン分析として、飼料関係業者等の中で一般的に用いられている過ギ酸処理によりメチオニンスルホンに酸化した後、塩酸加水分解を行う分析法について予備検討を行った。その結果、メチオニンスルホンのピークが妨害ピークと重なったものの、妨害ピークを差し引いても豚用配合飼料の種類や含有メチオニン量に関わらず、飼料分析基準収載の同時分析法と比較しメチオニン測定値が増加する傾向が確認され、当該方法により低回収率の改善が期待された。一

方，過ギ酸酸化後の臭化水素酸添加については，メチオニン測定値が増加する傾向は確認できず，臭化水素酸の添加による更なる回収率の増加は期待できないという結果となった。

文 献

- 1) 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構：日本飼養標準 豚 (2013).
- 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，農林省令第 35 号 (1976).
- 3) みどりの食料システム戦略：<https://www.maff.go.jp/j/kanbo/kankyo/seisaku/midori/attach/pdf/index-10.pdf>
- 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) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構：日本標準飼料成分表 (2009 年版) (2009).

5 とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル中のアフラトキシン、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の検討

渡辺 ちとせ^{*1}, 林 菜月^{*2,3}

Study of Determination Method of Aflatoxin, Sterigmatocystin and Zearalenone in Corn Dried Distillers Grains with Solubles by LC-MS/MS

WATANABE Chitose^{*1} and HAYASHI Natsuki^{*2,3}

(^{*1} Sendai Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) (Now National Livestock Breeding Center),

^{*2} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC,

^{*3} Institute of Food Research, National Agriculture and Food Research Organization)

We have studied a quantitative determination method of the concentration of aflatoxin (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂), sterigmatocystin (STC), and zearalenone (ZEN) in brans and food processing by-products, and oil seed meal using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

AFs, STC and ZEN were extracted with acetonitrile-water (21:4), and the extracted solution was centrifuged. The supernatant (10 mL) was transferred to another centrifuge tube, added with magnesium sulfate and sodium chloride, and shaken. Organic layer was purified with two types of columns (Captiva EMR-Lipid, Agilent Technologies, Inc.; CA, US and MultiSep #226 AflaZon+, Romer Labs Division Holding GmbH; Getzersdorf, Austria), and injected into LC-MS/MS to determine the concentration of AFs, STC and ZEN. LC separation was then carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 1.8 μm, Agilent Technologies Inc.) with a gradient of 0.5 mmol/L ammonium acetate-0.1 % formic acid aqueous solution and 0.5 mmol/L ammonium acetate-0.1 % formic acid methanol solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used for AFs and STC, while the negative mode electrospray ionization (ESI-) was used for ZEN.

Corn dried distillers grains with solubles was used as an analytical sample to confirm the concentration of each mycotoxin in the effluent fraction from MultiSep 226 AflaZon+. As a result, good recoveries were obtained with 0-0.5 mL for AFs, and with 0.5 mL or more for STC and ZEN, whereas ionization suppression due to matrix effect was observed for AFG₁. The necessity to reduce the matrix effect was thus suggested.

Key words: aflatoxin; sterigmatocystin; zearalenone; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); brans and food processing by-product; oil seed meal; corn dried distillers grains with solubles

^{*1} 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, 現 独立行政法人家畜改良センター

^{*2} 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} 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門

キーワード：アフラトキシン；ステリグマトシスチン；ゼアラレノン；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；そうこう類；植物性油かす類；とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル

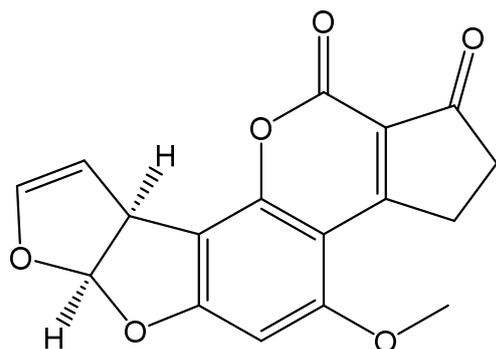
1 緒 言

現在，独立行政法人農林水産消費安全技術センターでは，かび毒のうちアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンの分析は，飼料分析基準¹⁾第5章第3節1の「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「かび毒一斉法」という．）を中心に実施している．しかし，そうこう類及び植物性油かす類の中にはかび毒一斉法において，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」による真度等の目標値を満たさないものがあることから²⁾，他の分析法により分析を実施している，もしくは分析を実施していない成分がある．そうこう類及び植物性油かす類のかび毒の基準値は設定されていないものの，アフラトキシン及びゼアラレノンは配合飼料等で基準値³⁾が設定されており，ステリグマトシスチンは農林水産省の「サーベイランス・モニタリング中期計画」で調査対象として取り上げられている．従って，そうこう類及び植物性油かす類中のアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンについて，効率的な分析の実施及び分析を実施していない成分への対応のため，新規分析法を確立する必要がある．

そうこう類及び植物性油かす類中のかび毒分析が困難である要因は，それぞれの特異なマトリックスに由来する測定妨害であると考えられる．この問題を解決する方法として，同位体標識された内標準物質を用いる方法があり，飼料中のかび毒分析法にも応用されているが⁴⁾，かび毒一斉法において各分析対象の内標準物質を用いると分析コストの増加に加え，市販されている内標準物質が限定されていることから実用性にも欠ける．また，標準液の溶媒に試料マトリックスを用いるマトリックスマッチング法⁵⁾があるが，そうこう類及び植物性油かす類はかび毒汚染のないブランク試料の入手が困難である．

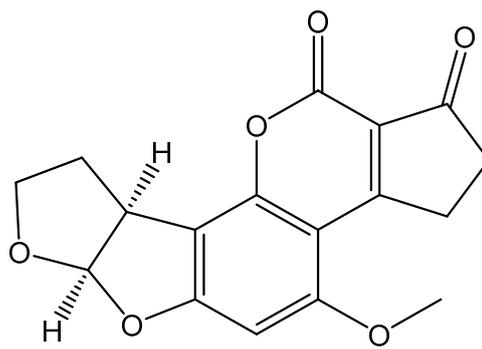
近年，迅速かつ簡便にマトリックスを分離する方法として急速に普及している QuEChERS 法⁶⁾は，かび毒分析にも適用されており，固相抽出法を取り入れた方法も報告されている⁷⁾．そこで，そうこう類及び植物性油かす類中のアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンについて，QuEChERS 法による粗精製後に固相抽出により精製し，液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という．）により定量する方法を検討したので報告する．なお，検討にはマトリックスが複雑であると考えられるとうもろこしジスチラーズグレインソリュブル（以下「DDGS」という．）を用いた．

参考にアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンの構造式等を Fig. 1 に示した．

Aflatoxin B₁

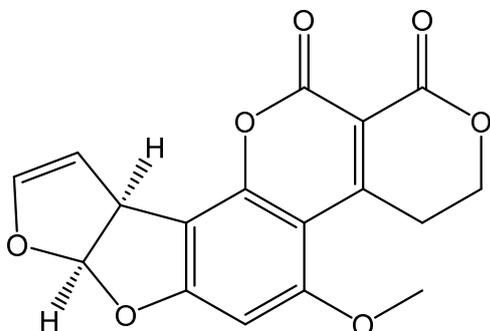
(6*aR*,9*aS*)-2,3,6*a*,9*a*-Tetrahydro-4-methoxycyclopenta[*c*]furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*][1]benzopyran-1,11-dione

C₁₇H₁₂O₆ MW: 312.06 CAS No.: 1162-65-8

Aflatoxin B₂

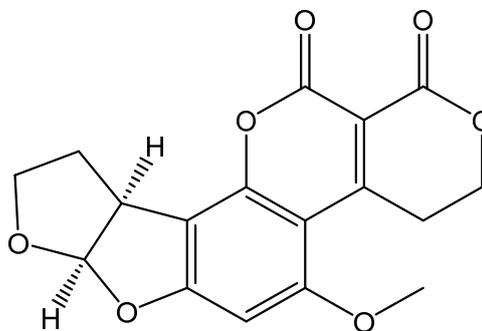
(6*aR*,9*aS*)-2,3,6*a*,8,9,9*a*-hexahydro-4-methoxy-cyclopenta[*c*]furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*][1]benzopyran-1,11-dione

C₁₇H₁₄O₆ MW: 314.08 CAS No.: 7220-81-7

Aflatoxin G₁

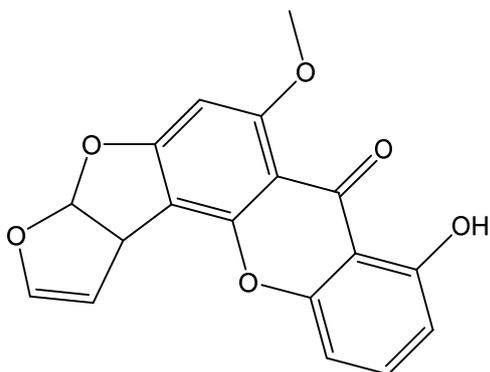
(7*aR*,10*aS*)-3,4,7*a*,10*a*-tetrahydro-5-Methoxy-1*H*, 12*H*-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*]pyrano[3,4-*c*][1]benzopyran-1,12-dione

C₁₇H₁₂O₇ MW: 328.06 CAS No.: 1165-39-5

Aflatoxin G₂

(7*aR*,10*aS*)-3,4,7*a*,9,10,10*a*-hexahydro-5-Methoxy-1*H*,12*H*-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*]pyrano[3,4-*c*][1]benzopyran-1,12-dione

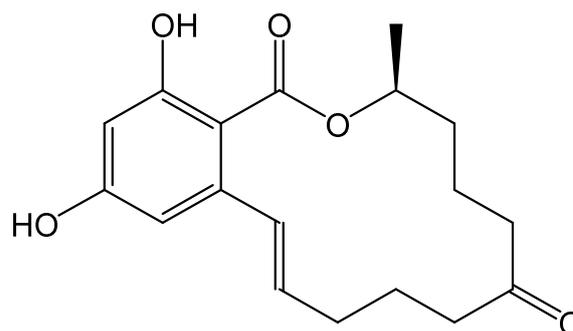
C₁₇H₁₄O₇ MW: 330.07 CAS No.: 7241-98-7



Sterigmatocystin

(3*aR-cis*)3*a*,12*c*-dihydro-8-hydroxy-6-methoxy-7*H*-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*c*]xanthen-7-one

C₁₈H₁₂O₆ MW: 324.28 CAS No.: 10048-13-2



Zearalenone

(4*S*,12*E*)-15,17-dihydroxy-4-methyl-3-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-12,15,17,19-tetraene-2,8-dione

C₁₈H₂₂O₅ MW: 318.36 CAS No.: 17924-92-4

Fig. 1 Chemical structures of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone

2 実験方法

2.1 試料

DDGS を目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し、分析用試料とした。

2.2 試薬

- 1) 塩化ナトリウムは試薬特級を用いた。アセトニトリルは LC/MS 用（関東化学製又は富士フィルム和光純薬製）を用いた。ギ酸、酢酸及びメタノールは LC/MS 用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。硫酸マグネシウムは鹿特級（関東化学製）を用いた。1 mol/L 酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）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) アフラトキシン標準原液
市販のアフラトキシン（B₁, B₂, G₁, G₂）混合標準液（各アフラトキシン 25 µg/mL, 富士フィルム和光純薬製）をアフラトキシン標準原液とした。
- 3) ステリグマトシスチン標準原液
ステリグマトシスチン標準品（富士フィルム和光純薬製, 純度 98.7 %）2.5 mg を量って 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、更に標線までアセトニトリルを加えてステリグマトシスチン標準原液を調製した（この液 1 mL は、ステリグマトシスチンとして 250 µg を含有）。
- 4) ゼアラレノン標準原液
ゼアラレノン標準品（富士フィルム和光純薬製, 純度 99.7 %）10 mg を量って 50 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、更に標線までアセトニトリルを加えてゼアラレノン標準原液を調製した（この液 1 mL は、ゼアラレノンとして 200 µg を含有）。
- 5) かび毒混合標準液
各かび毒標準原液の一部を混合し、アセトニトリルで正確に希釈しかび毒混合標準原液を調製した。
使用に際して、かび毒混合標準原液の一部を、アセトニトリル-水-酢酸（20.5+78.5+1）で正確に希釈し、Table 1 に示す濃度範囲の検量線作成用かび毒混合標準液を調製した。

Table 1 Concentration of mycotoxin mixed standard solution

Mycotoxin	Concentration of standard solution (ng/mL)										
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11
Aflatoxin B ₁	0.25	0.5	1	2	3	4	5	10	15	20	25
Aflatoxin B ₂	0.25	0.5	1	2	3	4	5	10	15	20	25
Aflatoxin G ₁	0.25	0.5	1	2	3	4	5	10	15	20	25
Aflatoxin G ₂	0.25	0.5	1	2	3	4	5	10	15	20	25
Sterigmatocystin	0.5	1	2	4	6	8	10	20	30	40	50
Zearalenone	2	4	8	16	24	32	40	80	120	160	200

6) 添加用かび毒混合標準液

各かび毒標準原液をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL あたりアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ として 6.25 ng, ステリグマトシスチンとして 12.5 ng 及びゼアラレノンとして 50 ng

を含む添加用かび毒混合標準液（以下「添加用混合標準液①」という．），1 mL あたりアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ として各 2.5 µg, ステリグマトシスチンとして 5 µg 及びゼアラレノンとして 20 µg を含む添加用かび毒混合標準液（以下「添加用混合標準液②」という．）を調製した．また，添加用混合標準液②をアセトニトリルで正確に 10 倍希釈し，添加用混合標準液③を調製した．

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 振り混ぜ機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）
- 3) 定容用チューブ：Digi TUBEs 15 mL ポリプロピレン SCP Science 製
- 4) 脂質吸着機能付きポリマーカラム（以下，「脂質除去用カラム」という．）：Captiva EMR-Lipid（充てん剤量 600 mg）Agilent Technologies 製
- 5) 多機能カラム：MultiSep 226 AflaZon+ Romer Labs 製
- 6) メンブランフィルター：DISMIC-13HP（孔径 0.45 µm, 直径 13 mm, 親水性 PTFE）東洋濾紙製
- 7) LC-MS/MS：
LC-MS/MS 1：
LC 部：Nexera X2 島津製作所製
MS 部：LCMS-8040 島津製作所製
LC-MS/MS 2：
LC 部：Nexera X2 島津製作所製
MS 部：QTrap 4500 AB Sciex 製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 25 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ，アセトニトリル-水（21+4）100 mL を加え，60 分間振り混ぜて抽出した．抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ，1700×g で 5 分間遠心分離した．

2) 塩析

上澄み液 10 mL を 15 mL プラスチック遠沈管に正確に入れ，塩化ナトリウム 0.25 g 及び無水硫酸マグネシウム 1 g を加え，直ちに手で振り混ぜた後，ボルテックスミキサーで 1 分間かき混ぜた．1700×g で 5 分間遠心分離し，上澄み液全量を定容用チューブに入れ，酢酸 100 µL を加えた後水で 10 mL に定容し，カラム処理 I に供する試料溶液とした．

3) カラム処理 I

脂質除去用カラムの下に 10 mL のガラス試験管を置き，試料溶液を脂質除去用カラムに入れ，全量流出させ，カラム処理 II に供する試料溶液とした．

4) カラム処理 II

多機能カラムにストップコックを連結し，その下に 10 mL のガラス試験管を置き，多機能カラムに試料溶液を入れてコックを開け，流出液を試験管にとった．流出液の一部を水で正確に希釈し，メンブランフィルターでろ過し，LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした．

5) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各検量線作成用かび毒混合標準液各 5 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。各装置の測定条件を Table 2 及び 3 に示した。

Table 2-1 Operation conditions of LC-MS/MS 1

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150mm, 1.8 µm), GL Sciences
Mobile phase	0.5 mmol/L ammonium acetate 0.1 % formic acid aqueous solution - 0.5 mmol/L ammonium acetate 0.1 % formic acid methanol solution (4:1) → 8 min → (1:4) 9 min → (0:10) (hold for 5 min) → (4:1) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Nebulizer gas	N ₂ (3 L/min)
Drying gas	N ₂ (15 L/min)
Interface temperature	350 °C
Heat block temperature	400 °C
Desolvation line temperature	250 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

Table 2-2 MS/MS parameters of LC-MS/MS 1

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
			Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
Aflatoxin B ₁	+	313	241	-	41
			-	285	24
Aflatoxin B ₂	+	315	287	-	28
			-	259	31
Aflatoxin G ₁	+	329	243	-	29
			-	200	42
Aflatoxin G ₂	+	331	245	-	31
			-	313	25
Sterigmatocystin	+	325	281	-	39
			-	310	26
Zearalenone	-	317	175	-	25
			-	131	31

Table 3-1 Operation conditions of LC-MS/MS 2

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150mm, 1.8 μm), GL Sciences
Mobile phase	0.5 mmol/L ammonium acetate 0.1 % formic acid aqueous solution - 0.5 mmol/L ammonium acetate 0.1 % formic acid methanol solution (4:1) → 8 min → (1:4) 9 min → (0:10) (hold for 5 min) → (4:1) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Ion source temperature	600 °C
Curtain gas	N ₂ (40 psi)
Cone gas	Air (80 psi)
Turbo gas	Air (80 psi)
Collision gas	N ₂ (8)
Capillary voltage	4500 V

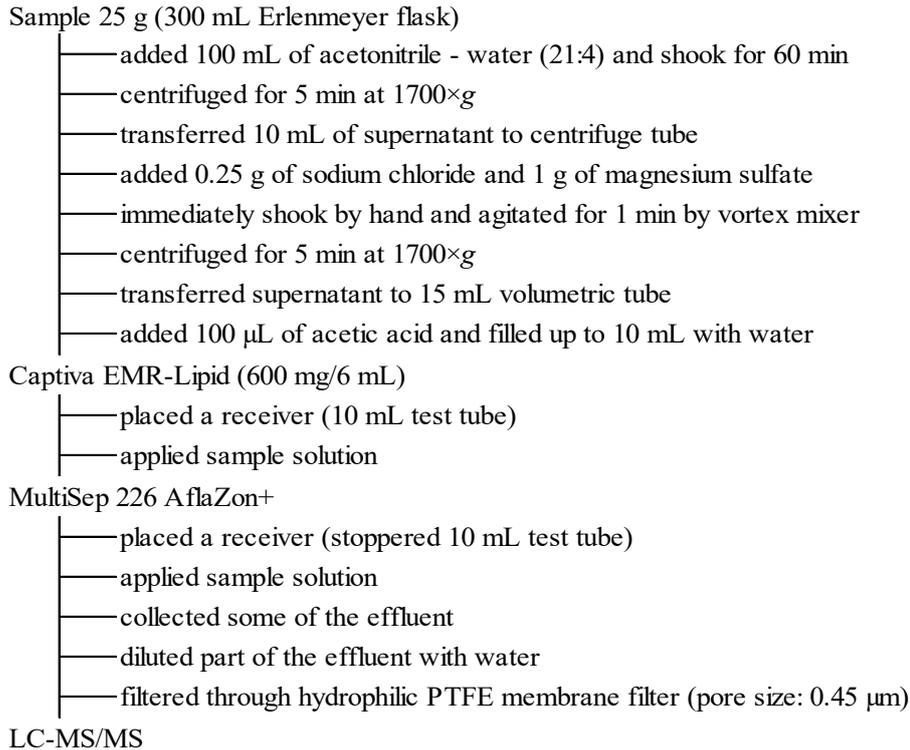
Table 3-2 MS/MS parameters of LC-MS/MS 2

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
			Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
Aflatoxin B ₁	+	313	241	-	49
			-	285	31
Aflatoxin B ₂	+	315	287	-	35
			-	259	39
Aflatoxin G ₁	+	329	243	-	35
			-	200	51
Aflatoxin G ₂	+	331	189	-	53
			-	313	33
Sterigmatocystin	+	325	310	-	33
			-	281	47
Zearalenone	-	317	175	-	32
			-	131	38

6) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の各かび毒量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone in corn distillers dried grains with solubles (DDGS)

2.5 脂質除去用カラムからの流出画分の確認

- 1) 添加用混合標準液①を脂質除去用カラムに入れ、流出液を 2 mL ごとに分取した。分取した流出液のうち 200 µL をそれぞれ正確にとり、これらに水 600 µL を正確に加え、メンブランフィルターでろ過し、LC-MS/MS 2 に供する試料溶液とした。得られた試料溶液を 2.4 の 5)及び 6)に従い定量し、回収率を求めた。
- 2) DDGS を 2.4 の 1)に従って抽出、遠心分離し、上澄み液 10 mL を 15 mL プラスチック遠沈管に正確に分取し、添加用混合標準液②25 µL (各アフラトキシンとして 0.025 mg/kg 相当量、ステリグマトシスチンとして 0.05 mg/kg 相当量及びゼアラレノンとして 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中にアフラトキシン B₁, B₂, G₁及び G₂として各 1.56 ng/mL, ステリグマトシスチンとして 3.13 ng/mL, ゼアラレノンとして 12.5 ng/mL 相当量)) を添加した (以下「添加試料溶液」という。)。これとは別に、上澄み液 10 mL を 15 mL プラスチック遠沈管に正確に分取した (以下「無添加試料溶液」という。)。添加試料溶液及び無添加試料溶液について、2.4 の 2)及び 3)に従い操作し、カラム処理 I における流出液を 2 mL ごとに分取した。分取した添加試料溶液の流出液 200 µL をそれぞれ正確にとり、これらに水 600 µL を正確に加え、メンブランフィルターでろ過し、添加回収率を求めるための試料溶液とした。また、分取した無添加試料溶液の流出液 195 µL をそれぞれ正確にとり、添加用混合標準液③5 µL (最終試料溶液中の各かび毒濃度は同上) を添加した後、水 600 µL を正確に加え、メンブランフィルターでろ過し、マトリックス効果を求めるための試料溶液とした。得られた試料溶液を 2.4 の 5)及び 6)に従い LC-MS/MS 2 を用いて定量し、回収率を求めた。

2.6 多機能カラムからの流出画分の確認

DDGS を 2.4 の 1) に従って抽出，遠心分離し，上澄み液 10 mL を 15 mL プラスチック遠沈管に正確に分取し，2.5 の 2) と同様に添加試料溶液及び無添加試料溶液を調製した．添加試料溶液及び無添加試料溶液について，2.4 の 2) から 4) に従い操作し，カラム処理 II における流出液を 0.5 mL ごとに分取した．分取した添加試料溶液の流出液 300 μ L をそれぞれ正確にとり，水 900 μ L を正確に加え，メンブランフィルターでろ過し，添加回収率を求めるための試料溶液とした．また，無添加試料溶液の流出液 195 μ L をそれぞれ正確にとり，添加用かび毒混合標準液③ 5 μ L（最終試料溶液中の各かび毒濃度は同上）を添加した後，水 600 μ L を正確に加え，メンブランフィルターでろ過し，マトリックス効果を求めるための試料溶液とした．得られた試料溶液を 2.4 の 5) 及び 6) に従い LC-MS/MS 2 を用いて定量し，回収率を求めた．

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 5) により調製した各かび毒混合標準液各 5 μ L を LC-MS/MS 2 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，アフラトキシン B₁，B₂，G₁ 及び G₂ はそれぞれ 0.25~25 ng/mL（注入量として 0.00125~0.125 ng 相当量）の範囲で，ステリグマトシスチンは 0.5~50 ng/mL（同 0.0025~0.25 ng 相当量）の範囲で，ゼアラレノン は 2~200 ng/mL（同 0.01~1 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，アフラトキシン B₁，B₂，G₁ 及び G₂ をそれぞれ 0.004~0.4 mg/kg，ステリグマトシスチンを 0.008~0.8 mg/kg，ゼアラレノンを 0.032~3.2 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かび毒濃度範囲に相当する．

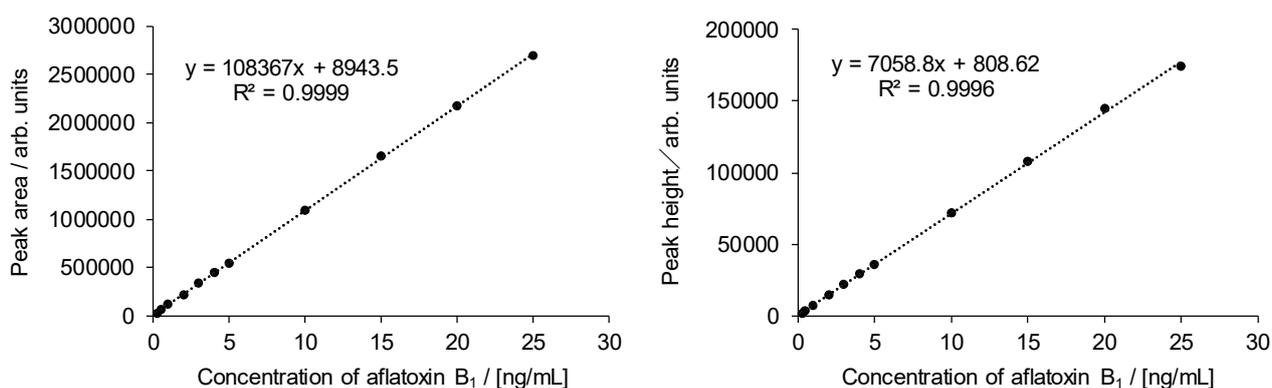


Fig. 2-1 Calibration curves of aflatoxin B₁ by peak area (left) and peak height (right)

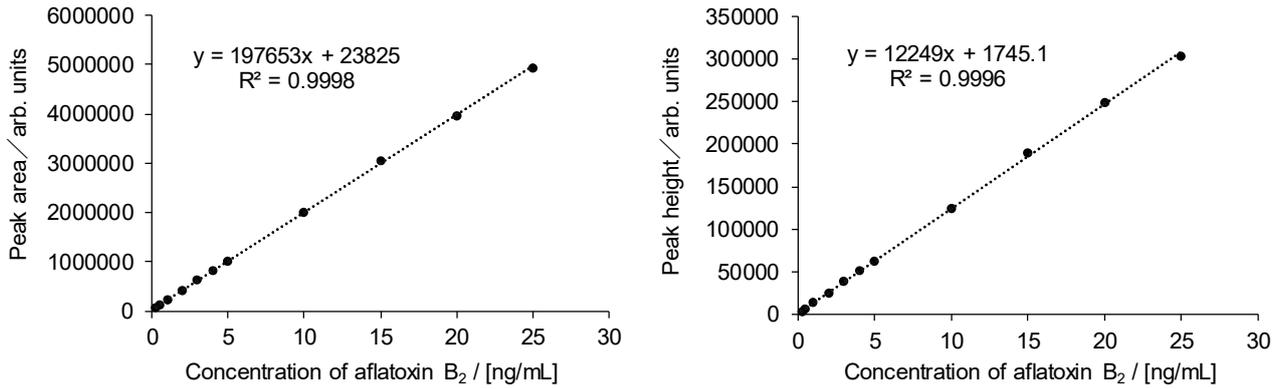


Fig. 2-2 Calibration curves of aflatoxin B₂ by peak area (left) and peak height (right)

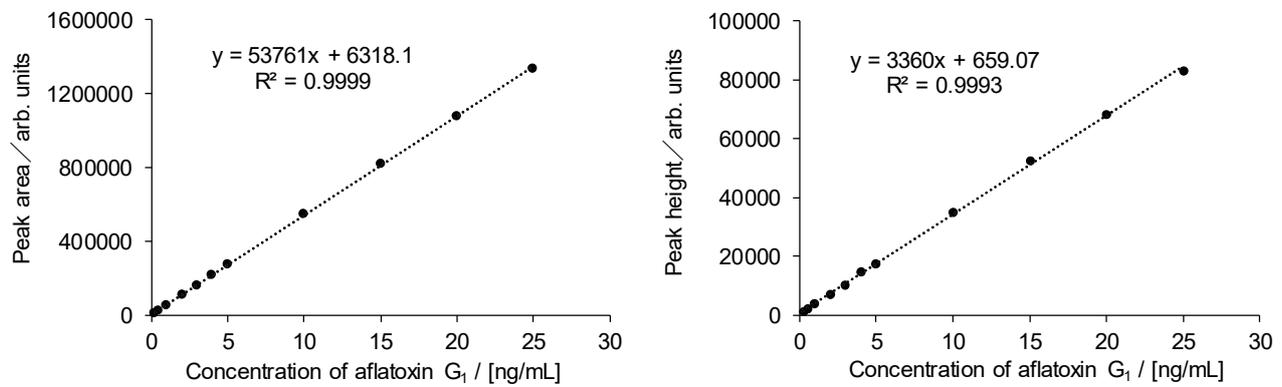


Fig. 2-3 Calibration curves of aflatoxin G₁ by peak area (left) and peak height (right)

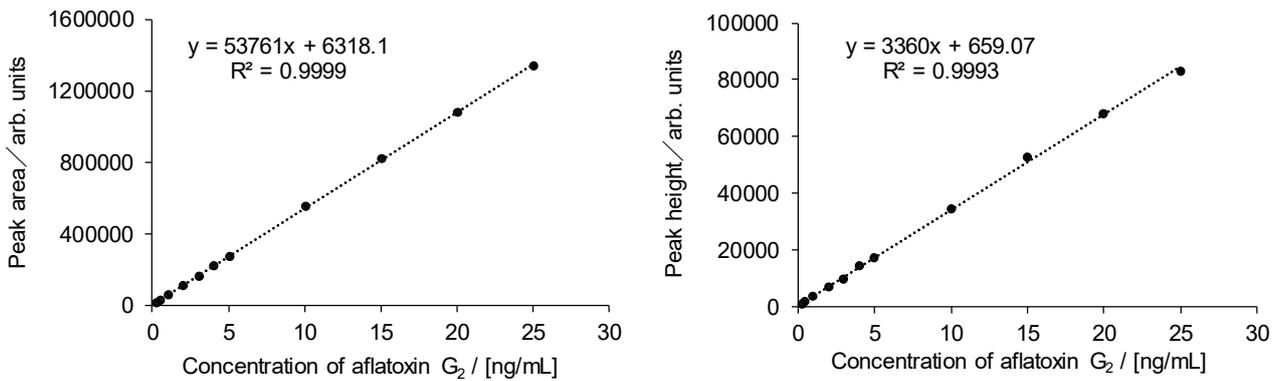


Fig. 2-4 Calibration curves of aflatoxin G₂ by peak area (left) and peak height (right)

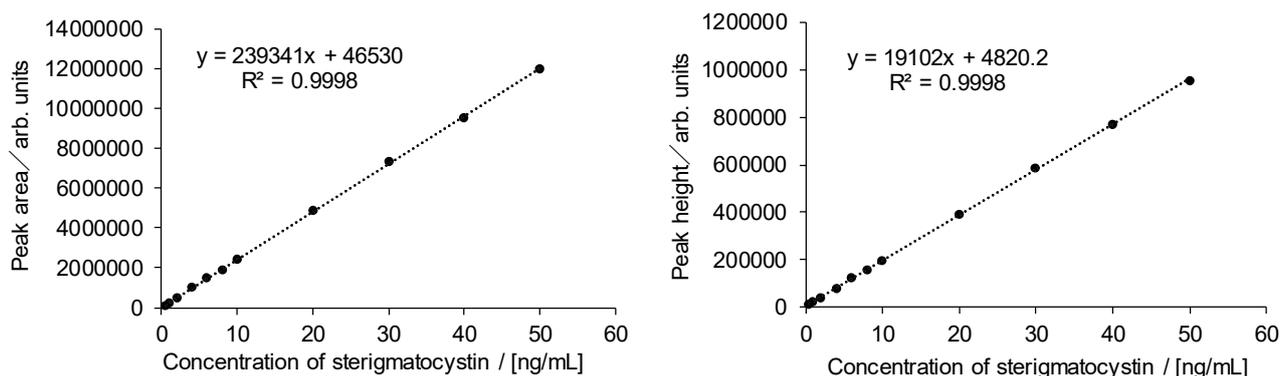


Fig. 2-5 Calibration curves of sterigmatocystin by peak area (left) and peak height (right)

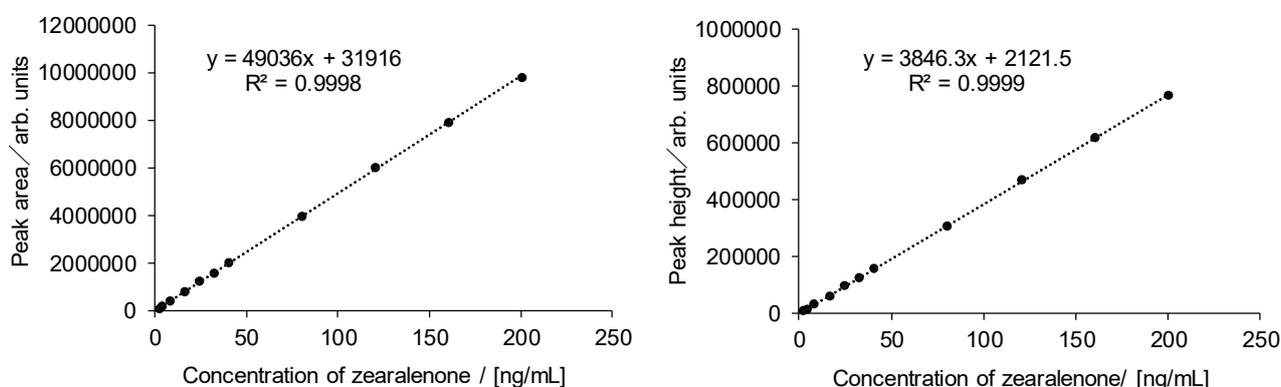


Fig. 2-6 Calibration curves of zearalenone by peak area (left) and peak height (right)

3.2 脂質除去用カラムからの流出画分の確認

2.5 の 1)により脂質除去用カラムからの流出画分を確認した。その結果は Table 4 のとおり、各かび毒の混合標準液を脂質除去用カラムに入れ、流出させた場合、各かび毒は 91.5%以上流出した。また、マトリックスの有無が各かび毒の流出に及ぼす影響を確認するため、2.5 の 2)により流出画分を確認した。なお、脂質除去用カラムのみでは精製が不十分であると考えられたため、同時にマトリックス効果を求めるための試料溶液を測定し、得られた流出画分の各かび毒の回収率をこれで除すことでマトリックス効果を補正した。その結果は Table 5 のとおり、各かび毒の流出液の回収率は 80.5%以上であり、マトリックスを含む場合、脂質除去カラムからの各かび毒の回収率が低下する傾向が見られた。

Table 4 Elution pattern of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone from Captiva EMR-Lipid (standard solution)

Fraction (mL)	Mycotoxins					
	Aflatoxin B ₁	Aflatoxin B ₂	Aflatoxin G ₁	Aflatoxin G ₂	Sterigmatocystin	Zearalenone
0-2	95.1	97.9	97.3	103	95.4	99.1
2-4	97.3	95.9	97.9	102	97.7	97.7
4-6	91.5	100	99.8	99.4	96.2	97.0
6-8	94.4	100	97.4	101	95.8	98.1
8-10	94.8	99.5	98.7	105	99.1	98.8

$n = 1$

Table 5 Elution pattern of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone from Captiva EMR-Lipid (matrix spike)

	Fraction (mL)	Mycotoxins					
		Aflatoxin B ₁	Aflatoxin B ₂	Aflatoxin G ₁	Aflatoxin G ₂	Sterigmatocystin	Zearalenone
Matrix effect ^{a)} (%)	0-2	73.5	59.8	71.0	88.3	98.6	88.2
	2-4	69.6	55.8	79.6	91.1	89.3	84.6
	4-6	72.6	58.3	77.2	91.8	87.8	83.4
	6-8	67.5	57.0	77.2	87.6	87.0	85.8
	8-10	71.2	56.3	78.5	88.2	85.9	85.0
Recovery (%)	0-2	59.7	50.7	69.9	77.9	79.4	77.3
	2-4	62.2	51.8	66.3	77.4	75.0	73.0
	4-6	59.9	49.0	64.0	78.7	72.4	71.7
	6-8	57.1	48.4	64.8	74.8	72.9	71.5
	8-10	58.0	48.9	64.2	80.6	72.2	74.8
Corrected recovery ^{b)} (%)	0-2	81.2	84.7	98.5	88.3	80.5	87.7
	2-4	89.4	92.8	83.3	85.0	83.9	86.2
	4-6	82.5	84.1	83.0	85.7	82.4	85.9
	6-8	84.6	85.0	83.9	85.3	83.8	83.3
	8-10	81.4	86.8	81.8	91.4	84.0	88.0

$n = 1$

a) Ratio of peak area of mycotoxins in the presence of matrix to that in the absence of matrix

b) $100 \times \text{recovery} / \text{matrix effect}$

3.3 多機能カラムからの流出画分の確認

2.6により多機能カラムからの流出画分の確認を実施した。その結果はTable 6のとおり、各アフラトキシンは0~0.5 mLの画分で91.4%以上、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンは0.5 mL以降の範囲で86.1%以上の流出を認めた。

また、アフラトキシン B₁, B₂及びG₂は0~0.5 mLの範囲でマトリックス効果が80.6%以上だったが、アフラトキシン G₁はすべての流出画分で80%を下回り、マトリックス効果を低減するための検討が必要と示唆された。なお、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンは、試料マトリックスの影響をほぼ受けずに測定が可能であった。

Table 6 Elution pattern of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone from MultiSep 226 AflaZon+

Fraction (mL)	Mycotoxins						
	Aflatoxin B ₁	Aflatoxin B ₂	Aflatoxin G ₁	Aflatoxin G ₂	Sterigmatocystin	Zearalenone	
0-0.5	83.2	86.8	79.4	80.6	97.5	94.1	
0.5-1	69.8	59.8	68.5	85.6	98.6	91.6	
1-1.5	54.7	41.3	55.4	67.1	80.5	73.1	
1.5-2	67.4	53.0	66.9	88.0	100	95.0	
Matrix effect ^{a)} (%)	2-2.5	66.2	52.5	66.8	83.8	103	94.2
	2.5-3	66.2	53.8	65.7	87.0	101	94.4
	3-3.5	65.0	55.9	66.7	82.4	103	99.7
	3.5-4	57.2	52.2	62.1	79.2	103	94.8
	4-4.5	57.7	52.4	63.6	75.9	101	99.2
	4.5-5	55.8	50.9	60.3	73.3	99.2	95.9
	0-0.5	93.1	94.2	91.4	94.4	67.0	49.4
0.5-1	67.8	55.0	60.9	80.6	86.1	98.7	
1-1.5	62.3	47.9	58.0	77.6	91.6	100	
1.5-2	58.3	49.5	60.7	77.7	94.6	96.3	
Recovery (%)	2-2.5	57.7	49.9	60.2	78.2	92.9	93.3
	2.5-3	57.7	48.7	60.4	77.4	94.5	91.0
	3-3.5	56.0	50.3	58.7	76.1	93.3	91.2
	3.5-4	50.7	45.6	55.4	70.5	92.5	92.3
	4-4.5	50.0	43.1	51.4	65.9	88.3	91.6
	4.5-5	48.7	44.0	50.9	61.2	88.0	91.1

$n = 1$

a) Ratio of peak area of mycotoxins in the presence of matrix to that in the absence of matrix

3.4 妨害物質の検討

DDGS 1 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS 1 に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、アフラトキシン B₂, G₁, G₂ 及びステリグマトシスチンについては定量を妨げるピークは認められなかったが、アフラトキシン B₁ 及びゼアラレノンについては、試料において標準液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、アフラトキシン B₁ 及びゼアラレノンであると判断した。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

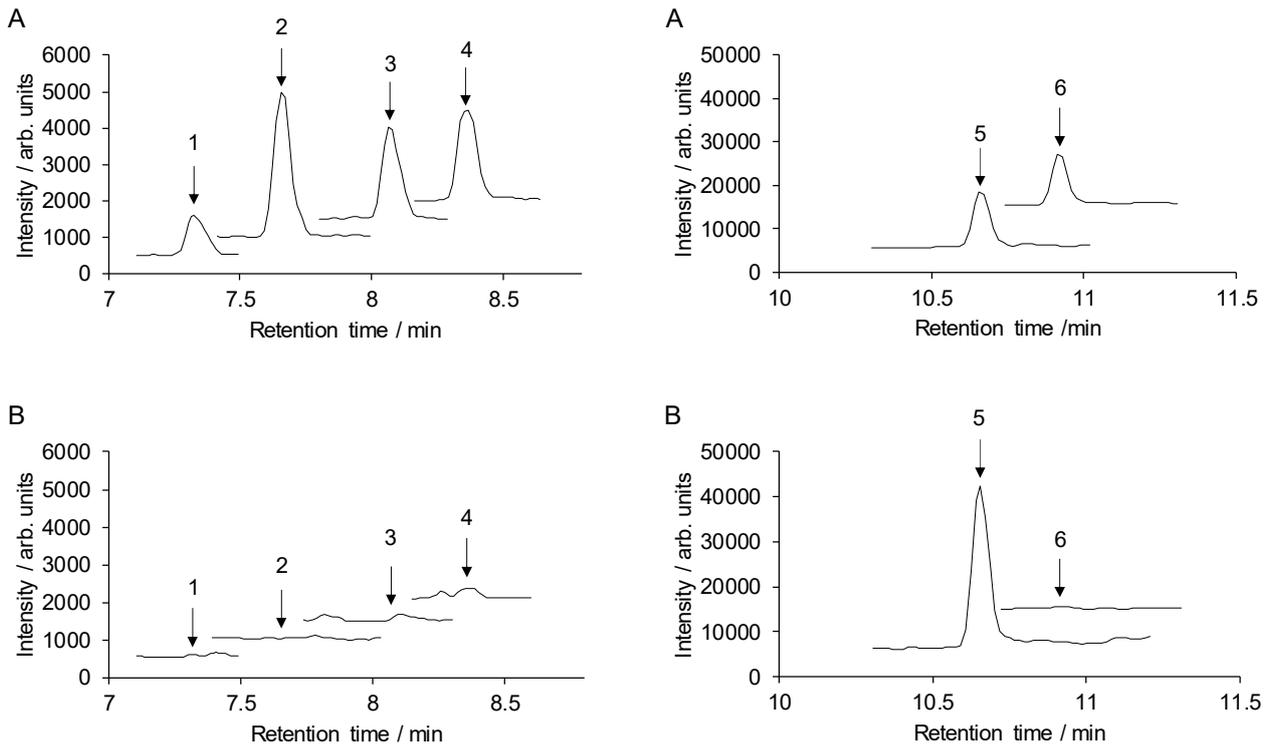


Fig. 3 Typical selected reaction monitoring chromatograms of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 3 and 4. Arrows indicate the retention times of 1: aflatoxin G₂, 2: aflatoxin G₁, 3: aflatoxin B₂, 4: aflatoxin B₁, 5: zearalenone and 6: sterigmatocystin. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (aflatoxins: 0.25 ng/mL each, sterigmatocystin: 0.5 ng/mL, zearalenone: 2.0 ng/mL),

B: Sample solution of DDGS

4 まとめ

DDGS 中のアフラトキシン、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンについて、QuEChERS 法による粗精製後に固相抽出により精製し、LC-MS/MS により定量する方法を検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線について、アフラトキシン (B₁, B₂, G₁ 及び G₂) は各 0.25~25 ng/mL (注入量として 0.00125~0.125 ng 相当量) , ステリグマトシスチンは 0.5~50 ng/mL (同 0.0025~0.25 ng 相当量) , ゼアラレノンは 2~200 ng/mL (同 0.01~1 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、アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ を各 0.004~0.4 mg/kg, ステリグマトシスチンを 0.008~0.8 mg/kg, ゼアラレノンを 0.032~3.2 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濃度範囲に相当する。
- 2) 脂質除去用カラムからの流出画分の確認をした結果、マトリックスを含む場合、脂質除去カラムからの各かび毒の回収率は低下する傾向が見られた。

- 3) 多機能カラムの流出画分を確認した結果、アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の回収率は 0~0.5mL の画分で、ステリグマトシスチン及びゼアラレノン は 0.5 mL 以降の画分で十分に流出した。
- 4) DDGS のマトリックス効果を確認した結果、アフラトキシン G₁ は多機能カラムの全ての流出画分においてマトリックスによる影響が認められ、マトリックス効果を低減するための検討が必要と示唆された。
- 5) DDGS について、本法に従って得られたクロマトグラムには各かび毒の定量を妨げるピークは認められなかった。

謝 辞

本研究に協力して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食品研究部門及び基盤技術研究本部高度分析研究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) 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).
- 2) 鈴木 知華，名塚 英一，加藤 耕一，青山 幸二：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の植物性油かす類に対する妥当性確認，飼料研究報告，41，118-121 (2016).
- 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) Jackson LC, Kudupoje MB, Yiannikouris A: Simultaneous multiple mycotoxin quantification in feed samples using three isotopically labeled internal standards applied for isotopic dilution and data normalization through ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26, 2697–2713 (2012).
- 5) Dzuman Z, Zachariasovan M, Lacina O, Veprikova Z, Slavikova P, Hajslova J: A rugged high-throughput analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices, *Talanta*, 121, 263-272 (2014).
- 6) Anastassiades M, Lehotay S J: Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *J. AOAC Int.*, 86 (2), 412-431 (2003).
- 7) 田村 昌義，中川 博之，宇山 敦生，望月 直樹：ペンタフルオロフェニルカラムを用いたトリコテセン系カビ毒の LC-MS/MS 高感度一斉分析法，食品衛生学雑誌，55 (1)，19-24 (2014).

6 乾牧草及び稲わら中のカドミウムの原子吸光光度計による定量法への湿式分解追加に係る妥当性確認

元木 太郎^{*1}, 板橋 葵^{*2}, 門屋 日菜^{*2}

Validation Study for Addition of Wet Decomposition to Determination Method of Cadmium in Grass Hay and Rice Straw by Atomic Absorption Spectrometer

MOTOKI Taro^{*1}, ITABASHI Aoi^{*2} and KADOYA Hina^{*2}

(*1 Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)
(Now Kanto Regional Agricultural Administration Office, Ministry of Agriculture,

Forestry and Fisheries of Japan),

^{*2} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have made a validation study for addition of wet decomposition to the determination method of cadmium in grass hay and rice straw. The method, which uses an atomic absorption spectrometer, has been listed in the Feed Analysis Standard of Japan.

Having heated a sample at 400 °C for 8 hours by an electric furnace, nitric acid and perchloric acid were added to the residue. The residue was further heated by sand bath. With the addition of water and hydrochloric acid, the residue was further heated. The heated solution was diluted with water, and then filtered. Cadmium in the filtrate was quantified by an atomic absorption spectrometer.

Recovery tests were conducted on timothy hay and rice straw. Cadmium was added at the levels of 0.1 and 1 mg/kg for timothy hay and 0.2 and 1 mg/kg for rice straw. The resulting mean recoveries ranged from 84.6 % to 101 % for timothy hay, and 86.2 % to 112 % for rice straw. The repeatability in the form of the relative standard deviations (RSD_r) was less than 7.0 % for timothy hay and less than 4.0 % for rice straw. After the sample amount reduction to prevent bumping, the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of rice straw were reevaluated, and determined as 0.05 mg/kg and 0.2 mg/kg, respectively.

Key words: cadmium; atomic absorption spectrometer; rice straw; glass hay

キーワード：カドミウム；原子吸光光度計；稲わら；乾牧草

1 緒 言

飼料中のカドミウムは、配合飼料で 0.8 mg/kg, 乾牧草等で 1 mg/kg, 魚粉, 肉粉及び肉骨粉で 3 mg/kg の管理基準が定められている¹⁾。

カドミウムの分析法としては、試料の灰化後、酸による溶解を行い、原子吸光光度計により測定する方法が飼料分析基準²⁾（以下「飼料分析基準法」という。）に記載されている。しかし、令和元年度の野村ら³⁾による誘導結合プラズマ質量分析計法の妥当性確認を行う過程で、稲わらの飼料分析基準法での定量値が真値よりも低い可能性が示唆され、令和3年度に林ら⁴⁾の検討で、飼料分析基準法における灰化温度が高いと稲わらの定量値及び添加回収試験による回収率が低下すること

^{*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, 現 農林水産省関東農政局

^{*2} 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

が判明した。このとき、400 °C での灰化後、硝酸及び過塩素酸を用いて湿式分解する方法（以下「湿式分解追加法」という。）で、定量値及び回収率の向上が確認された。

そこで今回は、稲わら及び乾牧草について、飼料分析基準法への湿式分解の追加に係る妥当性確認を実施したので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び乾牧草（アルファルファ乾草，チモシー乾草及びスーダングラス乾草）を目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し，分析用試料とした。

2.2 試薬

1) 塩酸，硝酸及び過塩素酸は有害金属測定用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。水は Milli-Q Integral 5（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) カドミウム標準液

カドミウム標準原液は，カドミウム標準液（Cd 100）（富士フィルム和光純薬製，保証値 100.6 µg/mL，JCSS 対応）を用いた。使用に際して，カドミウム標準原液の一部を，塩酸（1+10）で正確に希釈し，1 mL 中にカドミウムとしてそれぞれ 0.02，0.04，0.08，0.2 及び 0.4 µg 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：SM 100 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数（仕様）1500 rpm）

2) 偏光ゼーマン原子吸光光度計：Z-2310 日立製作所製

2.4 定量方法

1) 試料溶液の調製

i 飼料分析基準法

飼料分析基準第 4 章第 1 節の「12 カドミウム」の「12.2 簡易法」に従った。詳細は以下のとおり。

分析試料 5.0 g を量って 100 mL のトールビーカーに入れ，電気炉中で穏やかに加熱し炭化させた後徐々に昇温し，480 °C で 15 時間加熱して試料を灰化させた。残留物に少量の水及び塩酸 10 mL を徐々に加え，更に水を加えて 30 mL とし，トールビーカーを時計皿で覆い，ホットプレート上で数分間煮沸した後放冷した。この液を水で 100 mL の全量フラスコに移し，更に標線まで水を加えた後，ろ紙（6 種）でろ過し，試料溶液とした。

ii 湿式分解追加法（飼料分析基準法との相違点を下線で示した。）

分析試料 5.0 g を量って 200 mL（稲わらの場合は試料 2.5 g 又は 5.0 g を 500 mL） のトールビーカーに入れ，電気炉中で穏やかに加熱し炭化させた後徐々に昇温し，400 °C で 8 時間加熱した。 残留物に硝酸 5 mL（稲わらの場合は 15 mL）及び過塩素酸 5 mL を加え，時計皿で覆い，ほとんど乾固するまで砂浴上で加熱分解した。なお，黒い残留物が残った状態で液量が減少した場合は砂浴から下ろし，放冷後，硝酸 1 mL 程度を加え，砂浴上で更に加熱を続けた。 分解が進み，黒い残留物がなくなり液色が薄くなった後，時計皿をはずし，ほとんど乾固するまで濃縮した後放冷した。残留物に少量の水及び塩酸 10 mL を徐々に加え，更に

水を加えて 30 mL とし、トールビーカーを時計皿で覆い、ホットプレート上で加熱した後放冷した。この液を水で 100 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えた後、ろ紙（6種）でろ過し、試料溶液とした。

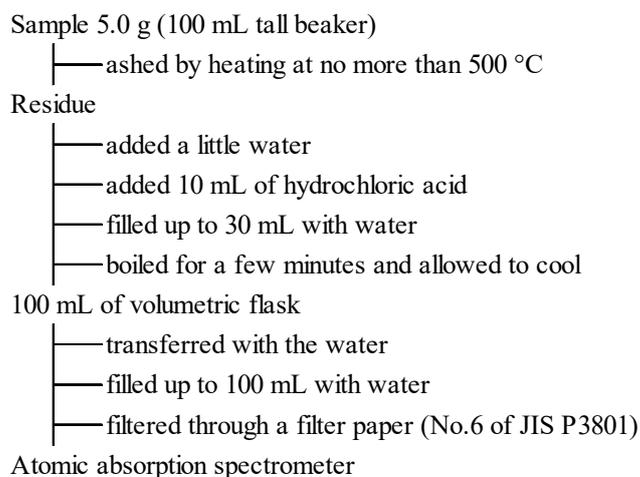
2) 原子吸光光度計による測定

試料溶液及び各標準液を原子吸光光度計によるアセチレン-空気フレーム中で波長 228.8 nm の吸光度を測定した。

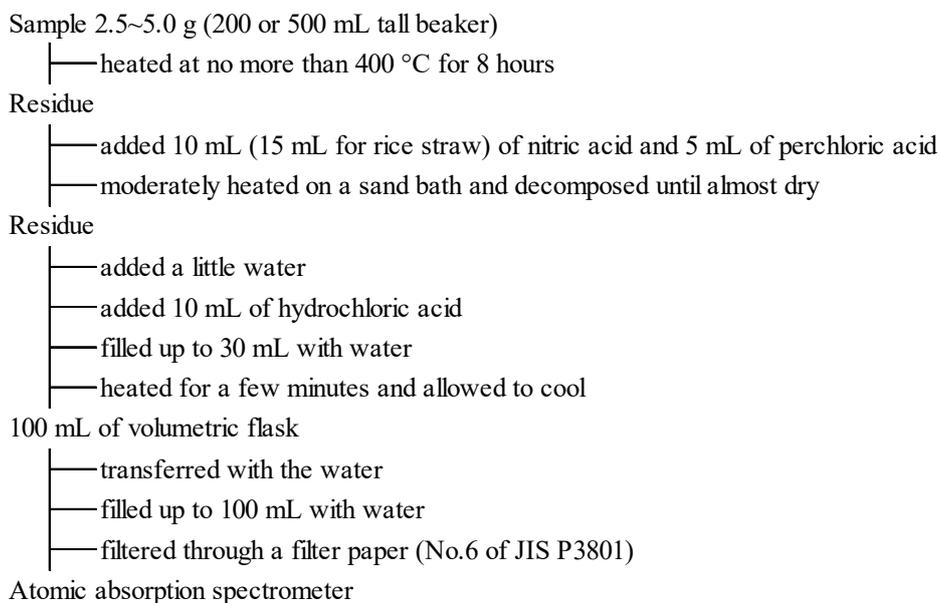
3) 計算

得られた吸光度から検量線を作成し、試料中のカドミウム量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 及び 2 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure (Analytical Standards of Feeds)



Scheme 2 Analytical procedure (method of wet decomposition)

2.5 添加回収試験

2.2 の 2) のカドミウム標準原液を添加に用いた。

乾牧草（アルファルファ乾草，チモシー乾草及びスーダングラス乾草）にカドミウムとして 0.1 及び 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 50 ng/mL），稲わらにカドミウムとして 0.2 及び 1 mg/kg 相当量（同 10 及び 25 ng/mL）となるように添加し，2.4 に従って定量し，平均回収率及び繰返し精度を求めた。ただし，稲わらに 0.2 mg/kg 相当量添加する場合は分析試料の採取量を 5.0 g とし，1 mg/kg 相当量添加する場合は 2.5 g とした。なお，乾牧草における湿式分解追加法での 0.1 mg/kg 相当量の添加回収試験については，砂浴上での加熱分解以降の工程を半量にダウンスケールして行った。

また，同時にカドミウムを添加しない試料ブランク溶液を調製し，回収率は試料ブランク溶液の値を差し引いて算出した。

3 結果及び考察

3.1 添加回収試験

2.5 により添加回収試験を実施した。

1) 飼料分析基準法

480 °C で灰化を行ったときの回収率は，アルファルファ乾草で 94.8 %，チモシー乾草で 69.8 %，スーダングラス乾草で 47.0 %，稲わらで 55.4 %となり，令和 3 年度に林らが検討した稲わらと同様に一部の乾牧草においても回収率が低くなることが確認された。

2) 湿式分解追加法

1) で回収率の低下が認められた試料のうち，チモシー乾草及び稲わらについて湿式分解を追加し，平均回収率及び繰返し精度を求めた。なお，硝酸及び過塩素酸での加熱分解の過程において，トールビーカー内の残留物の突沸により試料がトールビーカー外へ飛散するおそれがあるため，トールビーカーは 200 又は 500 mL 容のものをを用い，試料採取量は 2.5 又は 5.0 g とした。

その結果，Table 1 のとおりの成績が得られ，平均回収率及びその繰返し精度の相対標準偏差（RSD_r）はそれぞれ，乾牧草で 84.6~101 %及び 7.0 %以下，稲わらで 86.2~112 %及び 4.0 %以下であり，飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（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（以下）を満たしていた。

1) 真度：70 %以上 120 %以下

2) 精度：22 %以下（添加濃度 0.1 mg/kg），20 %以下（同 0.2 mg/kg），16 %以下（同 1 mg/kg）

Table 1 Recoveries for cadmium in method of wet decomposition

Feed types	Blank ^{a)} (mg/kg)	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
Timothy hay	ND	0.1	84.6	7.0
		1	101	5.2
Rice straw	0.377	0.2	112	1.8
		1	86.2	4.0

a) Mean ($n = 3$)

b) $100 \times (\text{mean of the five samples} - \text{natural contamination}) / \text{spiked level}$

c) Relative standard deviation of repeatability

ND: Not detected

3.2 定量下限及び検出下限の検討

飼料分析基準法においてカドミウムの定量下限は 0.1 mg/kg と規定されているが、湿式分解追加による稲わらについては、湿式分解時の突沸による試料の飛散を防ぐため試料採取量の上限を引き下げる必要があることから、定量下限及び検出下限について改めて検討を行った。

0.2 mg/kg 相当量（最終試料液中濃度 10 ng/mL 相当量）における添加回収試験を実施したところ、3.1 の 2) のとおり結果は良好であり、かつ、標準偏差の 10 倍は当該濃度を超えていなかった。従って定量下限の濃度は 0.2 mg/kg とした。

また、検出下限は、先の標準偏差に自由度 4、片側有意水準 0.05 の Student の t -値を乗じた値の 2 倍の値 (= 0.047) から 0.05 mg/kg とした。

設定した定量下限及び検出下限は、乾牧草等のカドミウムの管理基準値に対してそれぞれ 1/5 及び 1/20 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた基準値に対する目標値（定量下限：1/5 以下、検出下限：1/10 以下）を満たしていた。

4 まとめ

乾牧草及び稲わら中のカドミウムの定量法について、飼料分析基準法への湿式分解の追加に係る妥当性確認を実施したところ、以下の結果が得られた。

- 一部の乾牧草及び稲わらについて飼料分析基準法に基づき添加回収試験を行うと回収率が低くなることが確認された。そこで、乾牧草にカドミウムとして 0.1 及び 1 mg/kg 相当量、稲わらにカドミウムとして 0.2 及び 1 mg/kg 相当量を添加した試料について湿式分解追加法で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ところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。
- 稲わらについては、突沸による試料の飛散防止のため試料採取量を減らす必要があったことから、定量下限及び検出下限の再検討を行ったところ、定量下限は 0.2 mg/kg、検出下限は 0.05 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) 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の制定について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 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) 野村 昌代，伊藤 紗織，田端 麻里：飼料及び愛玩動物中の砒素，カドミウム，鉛及び水銀の迅速・多元素同時定量法の開発，飼料研究報告，45，67-83 (2020).
- 4) 林 菜月，元木 太郎：飼料及び愛玩動物用飼料中の砒素，カドミウム，鉛及び水銀の誘導結合プラズマ質量分析計による迅速・多元素同時分析法の開発，飼料研究報告，47，73-86 (2022).
- 5) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター飼料分析基準研究会，飼料分析法・解説，I，95-100 (2009).

精度管理**1 令和4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 2022)**

土井 雄悟*¹, 船水 悦子*², 井上 華歩*³,
小堀 拓也*⁴, 佐藤 琢実*⁵, 酒井 妙衣*⁶

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・・・幼令肉用牛育成・肉用牛肥育用配合飼料

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

※ B 試料（魚粉）の分析については，令和4年度は実施していない。

3 共通試料の調製**3.1 調製年月日**

令和4年6月16日及び6月17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**

目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎器で粉碎した幼令肉用牛育成・肉用牛肥育用配合飼料約 100 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）を袋に入れ，1 袋当たり約 180 g 入りの試料 340 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，現 肥飼料安全検査部

*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

*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
	2	8	6	1	8	8	2
区画番号	4	7	5	9	6	5	3
	9	3	7	4	4	9	6
	1	5	3	2	7	1	5

2) 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（総量約 100 kg）を用い、A 試料と同様に 1 袋当たり約 180 g 入りの試料 340 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	25	なたね油かす	10
大麦	25	精白米	3
DDGS	10	魚粉	3
大豆油かす	10	炭酸カルシウム	2
ごま油かす	10	食塩	2

3) D 試料

ロッキングミキサー（容量 400 L）で 10 分混合したほ乳期子豚育成用プレミックス 9 kg 入りの紙袋 9 袋をそれぞれ 2 等分し、約 4.5 kg 入りの袋を 18 袋作成した。このうち 9 袋を 1 セットとして計 2 セット作成し、それぞれのセットごとに各袋より一定量（約 20 g）を袋に入れ、1 袋当たり約 180 g 入りの試料 340 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，リン及びモネンシナトリウム

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

「令和 4 年度 飼料等の共通試料による分析鑑定実施要領」（127 ページ）による。

5 共通試料の均質性確認

A 試料では粗たん白質及び粗灰分、D 試料では銅及び亜鉛を分析し、Thompson らの harmonized protocol¹⁾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 及び D 試料の分析結果

試料 No.	A試料				D試料			
	粗たん白質 (%)		粗灰分 (%)		銅 (g/kg)		亜鉛 (g/kg)	
	run1	run2	run1	run2	run1	run2	run1	run2
1	19.79	19.43	5.73	5.81	31.68	31.03	53.95	51.77
2	19.93	19.46	5.75	5.75	31.14	30.90	52.13	50.87
3	20.03	20.06	5.90	5.78	32.09	33.47	52.45	56.10
4	19.80	19.93	5.70	5.72	33.25	31.82	55.14	53.17
5	20.08	19.43	5.80	5.86	31.84	30.79	53.68	51.90
6	20.13	19.85	5.80	5.69	31.87	31.31	55.17	53.54
7	19.72	20.30	5.75	5.78	31.00	31.56	51.57	53.48
8	19.78	19.87	5.81	5.80	31.10	31.05	51.23	52.99
9	20.00	20.10	5.75	5.87	31.56	31.94	53.62	52.41
10	20.28	20.58	5.79	5.85	30.59	31.30	53.96	52.93

表 4 A 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 φ	不偏分散 $V=S/\varphi$	分散比 $F_0=V_A/V_E$	F境界値 $F(\alpha=0.05)$
A試料	試料間	0.9950	9	0.1106	1.68	3.02
	粗たん白質分析誤差	0.6565	10	0.0657		
	総計	1.6516	19			
	A	0.0327	9	0.0036	1.30	3.02
	粗灰分	0.0279	10	0.0028		
	T	0.0396	19			
D試料	A	7.1226	9	0.7914	2.33	3.02
	銅	3.4037	10	0.3404		
	T	10.5263	19			
	A	16.4399	9	1.8267	0.94	3.02
	亜鉛	19.3373	10	1.9337		
	T	35.7772	19			

6 参加試験室

6.1 総数 206

- うち 飼料検査指導機関…39
- 飼料製造業者関係…140
- 飼料添加物製造業者関係…11
- 民間分析機関等…16

6.2 試料別参加試験室数

- A 試料…203
- C 試料…109
- D 試料…78

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 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及びD試料

試験 室番 号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン	
	分析値 (%)	No. z-score												
2	11.70	1 -0.46	19.92	3 0.73	3.12	2 -1.38	5.59	2 -0.68	6.01	1 0.60	0.860	2 -0.27	0.552	1 -0.44
5	11.91	1 0.34	19.62	4 -0.56	3.31	2 0.03	5.13	2 -1.69	5.73	1 -1.28	0.824	1 -1.26	0.552	1 -0.44
6	11.56	1 -1.00							5.92	1 0.00	0.921	2 1.40	0.569	1 0.82
7	12.07	1 0.97	19.77	4 0.08	3.47	1 1.23	5.67	2 -0.51	5.85	1 -0.47	0.865	2 -0.13	0.564	1 0.44
7			19.44	3 -1.34										
8	11.80	1 -0.07	19.24	4 -2.21	3.79	1 <u>3.63</u>	6.29	2 0.84	5.66	1 -1.75				
10	11.61	1 -0.81												
13	11.95	1 0.50	20.15	3 1.74	3.10	2 -1.53			5.77	1 -1.01				
15	11.83	1 0.03	19.68	3 -0.30	3.29	1 -0.11	5.99	1 0.18	5.84	1 -0.53	0.874	2 0.11	0.546	1 -0.89
17	11.87	1 0.19	20.13	2 1.65	3.07	1 -1.76			5.83	1 -0.60				
18	12.05	1 0.89	19.55	4 -0.87	3.24	2 -0.48			5.97	1 0.33	0.904	2 0.93		
20	11.82	1 0.00	19.98	3 1.00	3.45	1 1.08	5.21	2 -1.51	5.73	1 -1.28	0.868	2 -0.05	0.554	1 -0.29
23	11.74	1 -0.31	19.60	3 -0.65	3.22	2 -0.63			6.02	1 0.67	0.855	2 -0.41	0.549	1 -0.67
25	11.81	1 -0.03	19.77	2 0.08	3.16	1 -1.08	6.00	2 0.20	6.42	1 <u>3.37</u>	0.890	2 0.55	0.564	1 0.44
29	11.27	1 -2.13							5.85	1 -0.47			0.542	1 -1.19
30	11.66	1 -0.62	19.75	2 0.00	3.28	1 -0.18								
31	11.92	1 0.38	19.99	3 1.04	5.60	2 <u>17.19</u>			5.97	1 0.33				
32	11.60	1 -0.85	19.85	3 0.43	3.35	1 0.33	4.73	2 -2.56	5.83	1 -0.60				
34	11.77	1 -0.19	19.85	3 0.43	3.25	1 -0.41	6.00	2 0.20	5.60	1 -2.15	0.790	2 -2.20	0.560	1 0.14
41			19.88	3 0.56	3.32	2 0.11	6.12	3 0.46						
42	11.90	1 0.31	19.85	4 0.43	3.35	1 0.33	5.44	2 -1.01	5.94	1 0.13				
44	11.39	1 -1.66	20.00	4 1.08	4.21	1 <u>6.78</u>	4.11	1 <u>-3.92</u>	5.88	1 -0.26	0.800	2 -1.92	0.600	1 <u>3.14</u>
45	11.81	1 -0.03	19.60	3 -0.65	3.39	1 0.63	5.71	1 -0.42	6.06	1 0.94	0.906	2 0.99	0.563	1 0.37
46	11.45	1 -1.43	20.18	3 1.87					5.94	1 0.13	0.900	3 0.82	0.570	2 0.89
49	12.02	1 0.77	19.68	3 -0.30	3.20	2 -0.78	6.10	3 0.42	5.92	1 0.00	0.903	2 0.90	0.551	1 -0.52
50	12.56	1 2.87	19.69	3 -0.26	3.59	1 2.13	5.31	2 -1.29	6.02	1 0.67	0.914	2 1.21	0.603	1 <u>3.37</u>
58	12.01	1 0.73	20.21	3 2.00	3.14	2 -1.23	6.26	3 0.77	5.97	1 0.33	0.882	2 0.33	0.558	1 0.00
59	11.84	1 0.07	19.24	3 -2.21	3.24	1 -0.48			6.11	1 1.28	0.868	2 -0.05	0.542	1 -1.19
61	11.63	1 -0.73	19.82	3 0.30	3.27	2 -0.26			5.83	1 -0.60	0.848	2 -0.60	0.537	1 -1.57
62			20.76	1 <u>4.39</u>	3.27	1 -0.26	5.52	1 -0.84	5.92	1 0.00	0.908	1 1.04	0.565	1 0.52
63	11.97	1 0.58	19.74	3 -0.04	3.29	2 -0.11			5.77	1 -1.01	0.765	2 -2.89	0.545	1 -0.97
65	11.63	1 -0.73	19.64	4 -0.47	3.35	1 0.33			5.84	1 -0.53			0.661	1 <u>7.71</u>
66	11.85	1 0.11	20.02	3 1.17	3.37	2 0.48			5.95	1 0.20				
67	12.18	1 1.39	19.91	3 0.69	3.16	2 -1.08	6.18	2 0.60	5.99	1 0.47	0.872	1 0.05	0.562	1 0.29
68	12.06	1 0.93	19.82	3 0.30					5.90	1 -0.13	0.858	2 -0.33	0.571	1 0.97
69	11.77	1 -0.19	19.44	3 -1.34	3.48	1 1.31	6.20	2 0.64	5.45	1 <u>-3.17</u>	0.936	2 1.81	0.559	1 0.07
70	11.96	1 0.54	19.64	3 -0.47	3.25	1 -0.41	6.06	2 0.33	5.96	1 0.26	0.855	1 -0.41	0.558	1 0.00
72	11.99	1 0.65	20.06	3 1.34					5.68	1 -1.61				
73	11.78	1 -0.15	19.78	2 0.13	3.31	1 0.03			5.93	1 0.06	0.841	2 -0.79	0.553	1 -0.37
74	10.74	1 <u>-4.19</u>	18.84	4 <u>-3.95</u>					5.66	1 -1.75				
75	12.08	1 1.00	19.73	3 -0.08					5.90	1 -0.13				
76	11.93	1 0.42	19.57	3 -0.78	3.46	2 1.16			6.10	1 1.21	0.887	1 0.46	0.539	1 -1.42
77	10.87	1 <u>-3.68</u>	22.54	4 <u>12.14</u>	3.18	1 -0.93			5.97	1 0.33				
78	11.71	1 -0.42	19.93	3 0.78					6.03	1 0.74	0.832	2 -1.04	0.559	1 0.07
79	11.32	1 -1.94			3.25	1 -0.41			5.77	1 -1.01				
80	11.83	1 0.03	19.54	3 -0.91	3.28	1 -0.18	6.22	3 0.68	5.58	1 -2.29	0.970	2 2.75	0.537	1 -1.57
81	11.72	1 -0.38	19.73	2 -0.08	3.41	1 0.78	5.75	2 -0.33	6.08	1 1.07	0.943	2 2.00	0.540	1 -1.34
82	11.47	1 -1.35	19.69	4 -0.26					5.84	1 -0.53				
83	11.32	1 -1.94	19.60	2 -0.65	3.23	1 -0.56	5.99	2 0.18	5.92	1 0.00	0.850	2 -0.55	0.565	1 0.52
84	11.53	1 -1.12	19.43	1 -1.39	3.41	1 0.78			6.06	1 0.94				
85	11.50	1 -1.24	19.77	3 0.08	3.23	1 -0.56			5.98	1 0.40	0.812	2 -1.59	0.588	1 2.24
86	11.79	1 -0.11	19.33	4 -1.82	3.50	1 1.46	5.84	2 -0.14	5.78	1 -0.94	0.890	2 0.55	0.548	1 -0.74
87	11.68	1 -0.54			3.29	1 -0.11	5.76	2 -0.31	6.07	1 1.01	1.271	1 <u>11.03</u>	0.504	1 <u>-4.04</u>
88	11.93	1 0.42	19.86	3 0.47	3.28	1 -0.18	5.97	2 0.14	5.93	1 0.06	0.880	1 0.27	0.572	1 1.04
89	11.73	1 -0.34	19.74	3 -0.04	3.23	2 -0.56	6.12	4 0.46	5.63	1 -1.95	0.862	2 -0.22	0.552	1 -0.44
90	11.93	1 0.42					5.36	2 -1.19	5.91	1 -0.06				
93	11.43	1 -1.51	19.78	4 0.13	3.78	2 <u>3.55</u>			6.00	1 0.53				
94	12.09	1 1.04	19.78	3 0.13	3.37	1 0.48	5.84	3 -0.14	5.60	1 -2.15	0.870	2 0.00	0.555	1 -0.22
95	12.27	1 1.74	20.34	3 2.56					5.94	1 0.13	0.870	2 0.00	0.567	1 0.67
96	11.92	1 0.38	19.83	3 0.34	3.01	2 -2.21	5.85	4 -0.12	5.98	1 0.40	0.888	1 0.49	0.563	1 0.37

の分析成績 (1)

MN(管理分析法)		MN(飼料分析基準)		D試料				試験 室番 号	
分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	銅		亜鉛			クエン酸モランテル
				分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score	分析値 (g/kg)	No. z-score
				30.31	1 0.18	51.55	1 -0.46	30.1	1 -1.91
		26.4	3 1.43	26.51	1 <u>-3.53</u>	52.97	1 0.02	31.9	1 -0.63
		25.3	3 0.11	30.91	1 0.77	58.87	1 2.03	34.9	1 1.49
28.0	1 -1.00			30.00	1 -0.11	55.55	1 0.90	34.3	1 1.06
		25.0	3 -0.23	31.38	1 1.23	52.18	1 -0.24		
				32.52	1 2.35	53.37	1 0.16	31.5	1 -0.92
				30.10	1 -0.01	56.27	1 1.14		
		25.4	3 0.23						
				29.65	1 -0.46	52.83	1 -0.02	33.4	1 0.42
		25.1	3 -0.11						
				29.23	1 -0.87	49.03	1 -1.32	32.9	1 0.07
		24.1	3 -1.31	30.31	1 0.18	56.47	1 1.21		
31.3	1 1.06			30.35	1 0.22	55.05	1 0.73		
		24.7	3 -0.59						
		24.2	3 -1.19					33.1	1 0.21
				28.34	1 -1.74	46.66	1 -2.12		
				31.34	1 1.19	54.44	1 0.52		
								23.2	1 <u>-6.81</u>
29.3	1 -0.18								
		24.6	3 -0.71	29.72	1 -0.39	52.73	1 -0.05	30.6	1 -1.56
		25.8	3 0.71	33.37	1 <u>3.18</u>	50.99	1 -0.65		
		25.2	3 0.00	29.17	1 -0.93	51.01	1 -0.64	31.0	1 -1.27
		24.2	3 -1.19					32.0	1 -0.56
				29.72	1 -0.39	53.87	1 0.33	31.0	1 -1.27
29.7	1 0.06			29.11	1 -0.98	51.80	1 -0.37	31.7	1 -0.78
				29.10	1 -0.99	46.37	1 -2.22		
29.4	1 -0.12								
		23.9	3 -1.55					34.6	1 1.27

表5 A及びD試料

試験 室番 号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン	
	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
98	12.05	1 0.89	20.54	3 <u>3.43</u>					5.93	1 0.06	0.854	2 -0.44	0.559	1 0.07
99	11.99	1 0.65	19.80	3 0.21					5.91	1 -0.06				
100	11.52	1 -1.16	20.17	4 1.82	3.26	1 -0.33			5.93	1 0.06			0.558	1 0.00
101	11.43	1 -1.51	19.91	3 0.69	3.23	2 -0.56	5.60	2 -0.66	5.90	1 -0.13	0.954	2 2.31	0.562	1 0.29
102	11.60	1 -0.85	19.84	3 0.39	3.33	2 0.18	6.25	2 0.75	5.71	1 -1.41	0.861	2 -0.24	0.567	1 0.67
103	12.60	1 <u>3.02</u>	19.66	4 -0.39	3.37	1 0.48	6.16	2 0.55	5.46	1 <u>-3.10</u>	0.873	2 0.08	0.562	1 0.29
105	11.62	1 -0.77	19.75	1 0.00	3.31	1 0.03	5.50	2 -0.88	5.90	1 -0.13	0.920	2 1.37	0.550	1 -0.59
106	11.56	1 -1.00	20.10	3 1.52	3.27	1 -0.26	5.37	2 -1.16	5.97	1 0.33	0.870	2 0.00	0.554	1 -0.29
107	12.09	1 1.04	19.96	3 0.91	3.01	2 -2.21	5.74	3 -0.36	5.99	1 0.47	0.887	1 0.46	0.570	1 0.89
108	12.02	1 0.77	22.47	4 <u>11.83</u>	3.57	2 1.98			6.68	1 <u>5.12</u>				
110	11.82	1 0.00	19.51	3 -1.04	3.54	1 1.76	5.54	2 -0.79	5.97	1 0.33	0.887	2 0.46	0.559	1 0.07
111	12.37	1 2.13	19.05	4 <u>-3.04</u>	3.87	1 <u>4.23</u>	6.27	2 0.79	6.73	1 <u>5.46</u>	0.880	2 0.27	0.628	1 <u>5.24</u>
112	11.69	1 -0.50	19.88	3 0.56	3.25	1 -0.41			6.24	1 2.15				
113	11.99	1 0.65	19.74	3 -0.04	3.42	2 0.86			5.95	1 0.20			0.551	1 -0.52
114	11.53	1 -1.12	19.45	3 -1.30	3.16	2 -1.08			5.66	1 -1.75			0.559	2 0.07
115	11.42	2 -1.55	19.98	3 1.00					5.77	2 -1.01				
116	11.93	1 0.42	20.33	3 2.52					5.78	1 -0.94				
117	11.85	1 0.11	19.65	3 -0.43	3.64	2 2.51			6.05	1 0.87				
118	11.80	1 -0.07	20.15	4 1.74	3.48	1 1.31	6.15	1 0.53	5.49	1 -2.90	0.806	1 -1.76	0.559	1 0.07
120	9.91	1 <u>-7.41</u>	20.05	3 1.30	3.60	1 2.21	6.42	3 1.12	5.97	1 0.33	0.842	2 -0.77	0.556	1 -0.14
121														
122	12.09	1 1.04	19.92	3 0.73	3.02	2 -2.13	5.90	2 -0.01	5.97	1 0.33	0.883	1 0.35	0.553	1 -0.37
123	12.01	1 0.73	19.81	3 0.26	3.29	2 -0.11	6.40	2 1.08	6.00	1 0.53	0.877	2 0.19	0.575	2 1.27
124	11.98	1 0.62	19.72	3 -0.13	3.80	1 <u>3.70</u>	5.03	2 -1.91	5.97	1 0.33	0.825	2 -1.23	0.558	1 0.00
125	12.00	1 0.69	19.61	4 -0.60	3.27	2 -0.26	5.19	3 -1.56	5.64	1 -1.88				
127	12.00	1 0.69	19.70	2 -0.21	3.43	1 0.93			5.62	1 -2.02				
128	11.87	1 0.19	19.71	3 -0.17	3.26	1 -0.33	6.35	3 0.97	5.81	1 -0.74	0.956	2 2.36	0.552	1 -0.44
129	11.69	1 -0.50	19.17	4 -2.52	3.41	1 0.78								
131	11.48	1 -1.31	19.71	3 -0.17	3.14	2 -1.23	6.33	2 0.92	6.08	1 1.07	0.873	2 0.08	0.578	1 1.49
132	11.67	1 -0.58	19.20	4 -2.39	3.10	2 -1.53			6.04	1 0.80			0.560	1 0.14
133	11.89	1 0.27	19.81	3 0.26	3.30	2 -0.03	5.94	3 0.07	5.94	1 0.13	0.855	2 -0.41	0.538	1 -1.49
136	12.13	1 1.20							5.85	1 -0.47	0.885	2 0.41	0.570	1 0.89
137	11.56	1 -1.00	20.09	3 1.47			4.53	2 <u>-3.00</u>	5.88	1 -0.26				
138	11.95	1 0.50	19.63	4 -0.52	3.12	1 -1.38	6.08	3 0.38	5.73	1 -1.28	0.870	2 0.00	0.567	1 0.67
139	12.36	1 2.09	20.14	3 1.69	3.40	1 0.71	5.55	2 -0.77	5.59	1 -2.22				
140	11.65	1 -0.65	19.56	3 -0.82	3.24	2 -0.48	6.41	3 1.10	5.96	1 0.26	0.885	2 0.41	0.560	1 0.14
141	11.55	1 -1.04	19.45	1 -1.30	3.54	1 1.76	5.39	2 -1.12	5.94	1 0.13	0.858	2 -0.33	0.560	1 0.14
143	12.31	1 1.90	19.70	4 -0.21	3.38	1 0.56	6.54	2 1.38	5.78	1 -0.94	0.858	2 -0.33	0.545	1 -0.97
144			20.10	2 1.52										
145	12.06	1 0.93	19.84	3 0.39	3.33	1 0.18	5.26	2 -1.40	5.85	1 -0.47	0.875	1 0.13	0.564	1 0.44
146	11.99	1 0.65	19.87	4 0.52	3.40	1 0.71	5.69	4 -0.46	5.97	1 0.33	0.920	2 1.37	0.520	1 -2.84
147	11.63	1 -0.73	19.80	3 0.21	3.27	1 -0.26			5.41	1 <u>-3.43</u>				
148	11.43	1 -1.51	19.60	3 -0.65	3.37	2 0.48			6.11	1 1.28	0.864	2 -0.16	0.549	1 -0.67
149	11.94	1 0.46	19.95	3 0.87	3.35	1 0.33	5.87	2 -0.07	5.98	1 0.40	0.770	2 -2.75	0.555	1 -0.22
150	11.98	1 0.62	18.96	1 <u>-3.43</u>	3.38	1 0.56	5.88	2 -0.05	5.64	1 -1.88	0.870	2 0.00	0.560	1 0.14
153	11.87	1 0.19	19.50	1 -1.08	3.35	1 0.33			5.99	1 0.47			0.542	1 -1.19
157	11.28	1 -2.09	19.69	4 -0.26					5.66	1 -1.75				
158	11.77	1 -0.19	20.06	3 1.34	3.22	2 -0.63			5.81	1 -0.74	0.832	2 -1.04	0.553	1 -0.37
159	11.81	1 -0.03	19.61	4 -0.60	3.36	2 0.41	6.69	2 1.71	6.18	1 1.75	0.873	2 0.08	0.570	1 0.89
160	11.75	1 -0.27	19.77	3 0.08	3.21	2 -0.71	5.34	2 -1.23	5.59	1 -2.22	0.858	2 -0.33	0.566	1 0.59
162	11.69	1 -0.50	20.47	3 <u>3.13</u>	3.55	2 1.83			6.00	1 0.53	0.852	2 -0.49	0.575	1 1.27
164	11.91	1 0.34	19.69	3 -0.26	3.45	1 1.08	6.20	3 0.64	6.06	1 0.94	0.887	2 0.46	0.552	1 -0.44
166	11.95	1 0.50	19.63	3 -0.52	3.55	1 1.83	5.06	2 -1.84	5.67	1 -1.68	0.934	3 1.76	0.554	2 -0.29
168	11.17	1 -2.52	19.78	2 0.13	3.58	1 2.06	6.53	2 1.36	5.90	1 -0.13				
170	12.10	1 1.08	19.67	3 -0.34	3.00	2 -2.28			5.70	1 -1.48	0.881	2 0.30	0.554	1 -0.29
172	11.79	1 -0.11	20.11	3 1.56					5.96	1 0.26	0.895	2 0.68	0.558	1 0.00
179	11.46	1 -1.39	19.81	3 0.26	3.20	2 -0.78	5.25	1 -1.43	5.93	1 0.06	0.836	2 -0.93	0.524	1 -2.54
180	11.01	1 <u>-3.14</u>	19.57	3 -0.78	3.38	2 0.56			5.96	1 0.26	0.810	2 -1.65	0.599	1 <u>3.07</u>
181	12.11	1 1.12	19.29	3 -2.00	3.22	1 -0.63	5.72	2 -0.40	5.88	1 -0.26	0.852	2 -0.49	0.567	1 0.67
182	11.73	1 -0.34	20.08	3 1.43	3.22	2 -0.63	5.51	1 -0.86	5.86	1 -0.40	1.601	2 <u>20.12</u>	0.805	1 <u>18.51</u>

表5 A及びD試料

試験 室番 号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン	
	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
183	12.04	1 0.85	19.89	3 0.60	3.33	1 0.18	5.59	2 -0.68	5.91	1 -0.06				
184	12.09	1 1.04	19.69	3 -0.26	3.27	1 -0.26	5.47	1 -0.95	5.88	1 -0.26	0.764	1 -2.91	0.551	1 -0.52
186	11.10	1 -2.79	19.45	2 -1.30	3.82	1 <u>3.85</u>	5.71	1 -0.42	5.25	1 <u>-4.51</u>	0.877	2 0.19	0.524	1 -2.54
187	11.53	1 -1.12	20.06	3 1.34	3.21	1 -0.71								
189	11.75	1 -0.27	19.57	3 -0.78	3.42	1 0.86	6.18	3 0.60	5.99	1 0.47	0.845	2 -0.68	0.548	1 -0.74
190	12.16	1 1.31	19.59	4 -0.69	3.37	1 0.48			5.93	1 0.06				
191	11.81	1 -0.03	19.63	3 -0.52	3.38	2 0.56			5.94	1 0.13				
192	11.96	1 0.54	19.84	1 0.39	3.24	1 -0.48	6.12	2 0.46	5.95	1 0.20	0.815	2 -1.51	0.577	1 1.42
195														
198	11.73	1 -0.34	20.02	3 1.17	3.40	1 0.71	6.36	3 0.99	6.05	1 0.87	0.839	2 -0.85	0.568	1 0.74
202	11.74	1 -0.31	20.02	3 1.17	3.34	2 0.26			5.92	1 0.00				
205	11.93	1 0.42	20.06	3 1.34	3.45	1 1.08	5.67	2 -0.51	5.90	1 -0.13	0.922	2 1.43	0.557	1 -0.07
205			19.64	1 -0.47										
209	11.76	1 -0.23	19.69	4 -0.26	3.45	2 1.08			5.98	1 0.40				
210	11.89	1 0.27	19.80	3 0.21	3.35	1 0.33			5.80	1 -0.80	0.840	2 -0.82	0.535	1 -1.72
211	11.93	1 0.42	19.45	3 -1.30	3.27	1 -0.26			6.07	1 1.01				
213	12.04	1 0.85	19.81	3 0.26	3.11	2 -1.46			5.91	1 -0.06			0.559	1 0.07
214	11.93	1 0.42	19.59	3 -0.69	3.44	2 1.01			6.00	1 0.53				
215	11.47	1 -1.35	19.42	2 -1.43	3.29	1 -0.11	6.02	3 0.25	6.06	1 0.94	0.865	2 -0.13	0.566	1 0.59
217	11.96	1 0.54	20.19	3 1.91	3.28	2 -0.18	6.04	3 0.29	5.63	1 -1.95	0.959	2 2.45	0.574	1 1.19
219	11.74	1 -0.31	19.40	3 -1.52	3.46	1 1.16			5.89	1 -0.20	0.865	2 -0.13	0.555	1 -0.22
223	11.80	1 -0.07	19.93	3 0.78	3.51	2 1.53	5.99	3 0.18	6.00	1 0.53				
224	12.02	1 0.77	19.47	4 -1.21	3.23	1 -0.56	5.33	2 -1.25	5.72	1 -1.34				
225	11.75	1 -0.27	20.06	3 1.34	3.28	2 -0.18	5.47	2 -0.95	5.71	1 -1.41	0.889	2 0.52	0.558	1 0.00
226	11.93	1 0.42	19.79	3 0.17	3.28	2 -0.18	5.97	3 0.14	5.95	1 0.20	0.868	2 -0.05	0.549	1 -0.67
227	12.58	1 2.95	19.74	4 -0.04	3.39	1 0.63	6.33	3 0.92	5.43	1 <u>-3.30</u>	0.699	2 <u>-4.70</u>	0.123	1 <u>-32.60</u>
229	11.14	1 -2.63							5.71	1 -1.41				
230	11.82	1 0.00	19.53	4 -0.95	3.35	2 0.33	6.12	3 0.46	5.82	1 -0.67	0.841	2 -0.79	0.555	1 -0.22
231	11.98	1 0.62	19.78	3 0.13	3.44	1 1.01	5.64	2 -0.57	5.90	1 -0.13				
232	10.74	1 <u>-4.19</u>	19.91	2 0.69	2.61	2 <u>-5.20</u>	6.01	3 0.22	5.85	1 -0.47	0.797	2 -2.00	0.559	1 0.07
233	12.13	1 1.20	19.82	2 0.30	3.30	1 -0.03	5.59	2 -0.68	5.81	1 -0.74	0.820	2 -1.37	0.570	1 0.89
235	10.79	2 <u>-3.99</u>	19.56	2 -0.82	3.34	1 0.26	5.91	2 0.01	6.45	1 <u>3.57</u>				
236	11.78	1 -0.15	19.60	3 -0.65					5.50	1 -2.83				
237	11.75	1 -0.27	19.84	3 0.39					6.01	1 0.60				
239	11.23	1 -2.29	19.68	3 -0.30	3.36	2 0.41	6.45	3 1.19	5.86	1 -0.40	0.853	2 -0.46	0.557	1 -0.07
241	11.44	1 -1.47	18.73	2 <u>-4.43</u>					5.56	2 -2.42				
242	11.52	1 -1.16							5.98	1 0.40				
243	11.42	1 -1.55	19.79	1 0.17					6.02	1 0.67				
245	11.92	1 0.38	19.51	3 -1.04	3.25	2 -0.41	6.06	3 0.33	5.61	1 -2.09				
246	10.76	1 <u>-4.11</u>	19.89	3 0.60	5.74	3 <u>18.24</u>			3.35	1 <u>-17.33</u>	0.843	1 -0.74	0.444	1 <u>-8.54</u>
247	10.30	1 <u>-5.90</u>	19.62	1 -0.56	2.71	1 <u>-4.45</u>			6.06	1 0.94				
248	11.55	1 -1.04	19.94	3 0.82	3.26	2 -0.33	6.88	2 2.13	5.96	1 0.26	0.930	2 1.65	0.530	1 -2.09
249	12.19	1 1.43	20.29	3 2.34	3.42	1 0.86			5.88	1 -0.26	0.960	2 2.47	0.560	1 0.14
251	11.76	1 -0.23	19.75	3 0.00			5.72	2 -0.40	6.02	1 0.67	0.841	1 -0.79	0.554	1 -0.29
252	11.92	1 0.38	19.77	3 0.08	3.36	2 0.41	6.11	4 0.44	5.84	1 -0.53	0.921	1 1.40	0.568	1 0.74
253	11.98	1 0.62	19.59	2 -0.69	3.21	1 -0.71			6.08	1 1.07	0.718	2 <u>-4.18</u>	0.538	1 -1.49
255	11.88	1 0.23							4.84	1 <u>-7.28</u>	0.958	2 2.42	0.555	1 -0.22
256	11.81	1 -0.03	19.79	3 0.17	3.33	1 0.18	5.98	4 0.16	5.94	1 0.13	0.849	2 -0.57	0.579	1 1.57
261	12.02	1 0.77	19.55	3 -0.87	3.51	1 1.53								
262	11.92	1 0.38	19.50	3 -1.08					5.95	1 0.20	0.910	2 1.10	0.594	1 2.69
263	13.40	1 <u>6.13</u>	19.30	4 -1.95	3.22	1 -0.63	5.01	1 -1.95	5.88	1 -0.26				
266	11.60	1 -0.85	19.34	3 -1.78	3.32	2 0.11	6.66	3 1.64	5.89	1 -0.20	0.840	2 -0.82	0.550	1 -0.59
267	11.93	1 0.42	19.61	2 -0.60	3.37	1 0.48	5.93	2 0.05	5.85	1 -0.47	0.877	1 0.19	0.533	1 -1.87
270	11.82	1 0.00	19.83	4 0.34	3.33	1 0.18	5.35	2 -1.21	6.13	1 1.41	0.865	2 -0.13	0.548	1 -0.74
271	11.85	1 0.11	19.88	3 0.56	2.74	2 <u>-4.23</u>	6.06	2 0.33	5.97	1 0.33	0.850	1 -0.55	0.570	1 0.89
272	11.44	1 -1.47	19.83	3 0.34	3.27	2 -0.26	6.00	3 0.20	6.08	1 1.07	0.961	2 2.50	0.575	1 1.27
274	11.52	1 -1.16	18.98	3 <u>-3.35</u>					5.79	1 -0.87				
275	11.87	1 0.19	19.85	3 0.43	3.38	2 0.56	5.77	2 -0.29	6.03	1 0.74	0.872	2 0.05	0.529	1 -2.17
276	17.80	1 <u>23.21</u>	19.45	4 -1.30	2.35	1 <u>-7.15</u>	3.44	3 -5.38	6.04	1 0.80	0.914	2 1.21	0.546	1 -0.89
278	11.95	1 0.50	19.63	3 -0.52					6.04	1 0.80				

の分析成績 (3)

MN(管理分析法)		MN(飼料分析基準)		銅		亜鉛		クエン酸モランデル		試験 室番 号
分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	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	
										183
										184
										186
										187
		25.4	3 0.23	28.72	1 -1.37	50.66	1 -0.76	31.6	1 -0.85	189
										190
										191
31.3	1 1.06			30.42	1 0.29	55.40	1 0.85	33.9	1 0.78	192
										195
28.9	1 -0.43					49.15	1 -1.27			198
										202
				32.32	1 2.15	57.56	1 1.58			205
										205
										209
										210
										211
		26.0	3 0.95							213
										214
										215
										217
31.5	2 1.19									219
31.6	2 1.25									223
										224
		24.0	3 -1.43	33.28	1 3.09	53.51	1 0.20	33.3	1 0.35	225
				30.35	1 0.22	54.13	1 0.41	33.1	1 0.21	226
										227
										229
				28.08	1 -1.99	46.74	1 -2.10			230
										231
										232
										233
										235
										236
		25.7	3 0.59							237
				28.48	1 -1.60	46.05	1 -2.33			239
										241
		24.6	3 -0.71	28.04	1 -2.03	55.89	1 1.01	33.3	1 0.35	242
										243
										245
										246
										247
27.0	1 -1.63			30.26	1 0.13	56.90	1 1.36	35.2	1 1.70	248
				30.14	1 0.01					249
										251
										252
						54.30	1 0.47			253
				29.34	1 -0.76	48.76	1 -1.41			255
				30.09	1 -0.02	52.33	1 -0.19	33.4	1 0.42	256
										261
										262
										263
		25.4	3 0.23					31.9	2 -0.63	266
										267
				30.56	1 0.43	54.71	1 0.61			270
		25.2	3 0.00					34.7	1 1.34	271
32.1	2 1.56			30.26	1 0.13					272
27.8	1 -1.12									274
		24.1	3 -1.31					35.0	1 1.56	275
				30.73	1 0.59	53.14	1 0.08			276
		25.7	3 0.59							278

表5 A及びD試料

試験室番号	水分		粗たん白質		粗脂肪		粗繊維		粗灰分		カルシウム		リン	
	分析値 (%)	No. z-score												
279	11.98	1 0.62	19.96	2 0.91	3.33	1 0.18			6.09	1 1.14				
283	11.59	1 -0.89	19.86	3 0.47	3.26	2 -0.33	6.42	3 1.12	5.99	1 0.47	0.842	2 -0.77	0.551	1 -0.52
286	11.84	1 0.07	19.75	3 0.00	3.18	2 -0.93	6.10	3 0.42	5.97	1 0.33	0.872	2 0.05	0.571	1 0.97
288	11.85	1 0.11	19.74	3 -0.04	3.18	2 -0.93	4.35	2 -3.39	5.92	1 0.00	0.909	2 1.07	0.661	1 7.71
289	11.92	1 0.38	19.92	3 0.73	3.14	2 -1.23	6.51	2 1.32	5.75	1 -1.14	0.840	2 -0.82	0.560	1 0.14
290	11.72	1 -0.38	19.63	3 -0.52	3.12	1 -1.38								
291														
293	11.99	1 0.65	19.89	3 0.60					5.60	1 -2.15				
294	11.90	1 0.31	19.48	3 -1.17	3.12	2 -1.38	5.85	1 -0.12	5.89	1 -0.20	0.927	2 1.56	0.540	1 -1.34
295	11.80	1 -0.07	20.23	3 2.08	3.17	2 -1.01			5.96	1 0.26	0.837	2 -0.90	0.528	1 -2.24
296	11.58	1 -0.93	19.63	3 -0.52					5.64	1 -1.88	0.814	2 -1.54	0.539	1 -1.42
299	12.12	1 1.16	20.22	3 2.04	3.30	2 -0.03			5.95	1 0.20	0.893	2 0.63	0.576	1 1.34
301	12.69	1 3.37	19.75	4 0.00	3.00	1 -2.28			6.01	1 0.60				
302	11.78	1 -0.15	19.11	1 -2.78	3.43	1 0.93	5.19	2 -1.56	5.96	1 0.26	0.826	2 -1.21	0.563	1 0.37
305	11.92	1 0.38							5.89	1 -0.20				
306	11.96	1 0.54	20.09	3 1.47	3.46	1 1.16	5.27	2 -1.38	5.71	1 -1.41				
307	11.56	1 -1.00	19.55	3 -0.87	3.35	1 0.33			5.91	1 -0.06	0.888	2 0.49	0.556	1 -0.14
310	11.44	1 -1.47	19.56	2 -0.82	3.89	2 4.38	5.73	3 -0.38	5.49	1 -2.90	0.919	1 1.34	0.546	1 -0.89
311	11.87	1 0.19	20.30	3 2.39	3.27	3 -0.26	6.01	3 0.22	5.94	1 0.13	0.776	2 -2.58	0.589	1 2.32
312	11.96	1 0.54	19.60	3 -0.65					5.90	1 -0.13	0.875	2 0.13	0.576	1 1.34
313	11.37	2 -1.74	20.03	3 1.21					5.80	2 -0.80				
317	11.71	1 -0.42	19.74	3 -0.04	3.27	1 -0.26	5.86	2 -0.09	5.92	1 0.00	0.862	2 -0.22	0.535	1 -1.72
319	11.66	1 -0.62	19.74	1 -0.04	3.22	1 -0.63	6.19	2 0.62	5.74	1 -1.21	0.807	1 -1.73	0.559	1 0.07
322														
323			19.78	4 0.13	3.22	2 -0.63								
323			19.52	5 -1.00	3.18	3 -0.93								
326	11.79	1 -0.11	19.67	3 -0.34	3.02	1 -2.13	5.65	2 -0.55	5.74	1 -1.21	0.828	2 -1.15	0.535	1 -1.72
327	11.88	1 0.23	19.91	3 0.69	3.51	1 1.53	6.22	3 0.68	6.02	1 0.67	0.830	1 -1.10	0.578	1 1.49
337	11.66	1 -0.62	19.65	3 -0.43	3.48	1 1.31	6.18	3 0.60	5.93	1 0.06	0.912	2 1.15	0.559	1 0.07

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
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
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
	3 燃焼法	3 その他	3 自動分析機		3 その他	
	4 自動分析機		4 その他			
	5 その他					

の分析成績 (4)

MN(管理分析法)		MN(飼料分析基準)		銅		亜鉛		クエン酸モランテル		試験 室番 号
分析値 (g(力価)/t)	No. z-score	分析値 (g(力価)/t)	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	
				27.60	1 -2.46	54.95	1 0.69	29.8	1 -2.13	279
				28.87	1 -1.22	53.24	1 0.11			283
		25.0	3 -0.23	31.36	1 1.21	54.21	1 0.44	30.6	1 -1.56	286
										288
										289
30.3	2 0.43									290
										291
										293
		26.8	3 1.91	29.50	1 -0.60	50.84	1 -0.70	31.6	1 -0.85	294
										295
								31.4	1 -0.99	296
										299
31.3	1 1.06			30.19	1 0.06	51.54	1 -0.46			301
				30.08	1 -0.03	49.28	1 -1.23			302
										305
										306
										307
										310
				29.50	1 -0.60	51.33	1 -0.53			311
		26.4	3 1.43	28.94	1 -1.15	52.44	1 -0.15	32.1	1 -0.49	312
										313
				29.08	1 -1.01	54.29	1 0.47	33.4	1 0.42	317
29.4	1 -0.12	25.2	3 0.00	30.71	1 0.57	51.79	1 -0.37	32.8	1 0.00	319
										322
										323
										323
		25.5	3 0.35	30.42	1 0.29	56.50	1 1.22	29.3	1 -2.48	326
29.2	1 -0.25									327
				28.88	1 -1.21	51.66	1 -0.42			337

モネンシンナトリウム (MN)

No. 分析方法

- 1 迅速定量法
- 2 フローインジェクション法
- 3 液体クロマトグラフ法
- 4 微生物学的定量法

銅

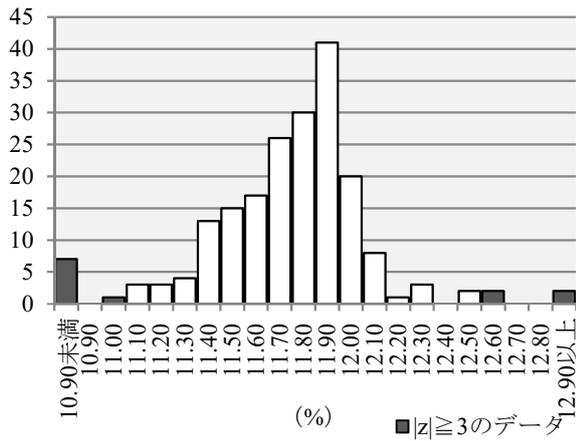
No. 分析方法

- 1 飼料分析基準
- 2 その他

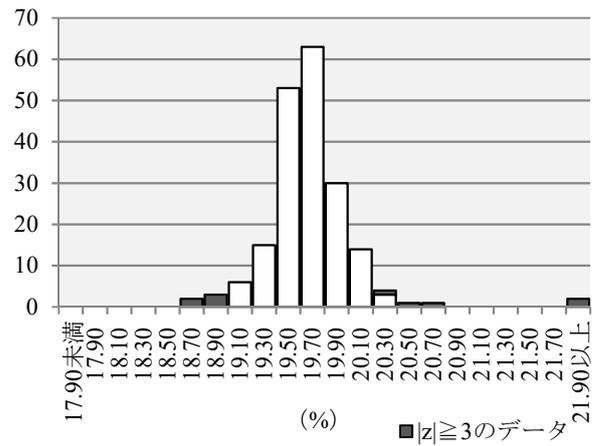
亜鉛

No. 分析方法

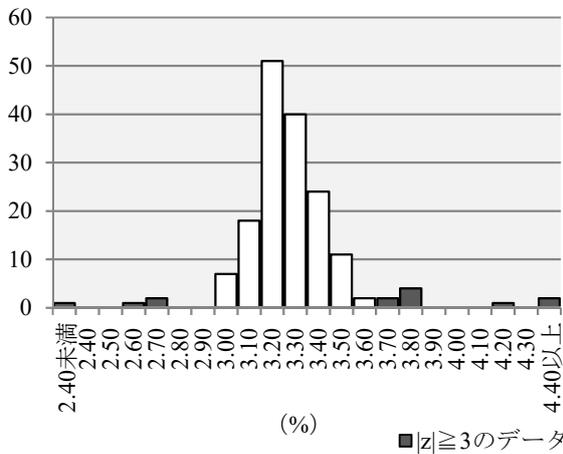
- 1 飼料分析基準
- 2 その他



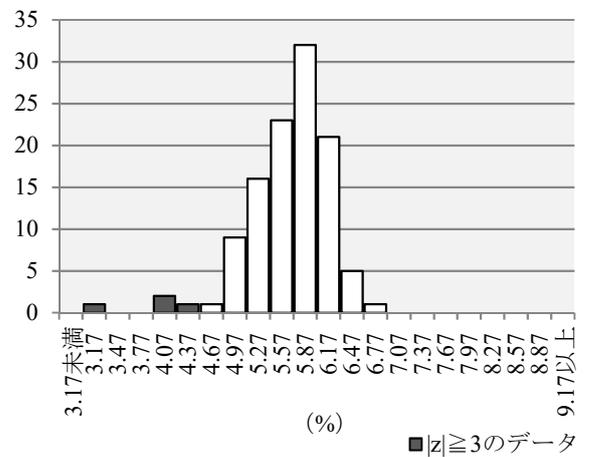
水分 (A 試料)



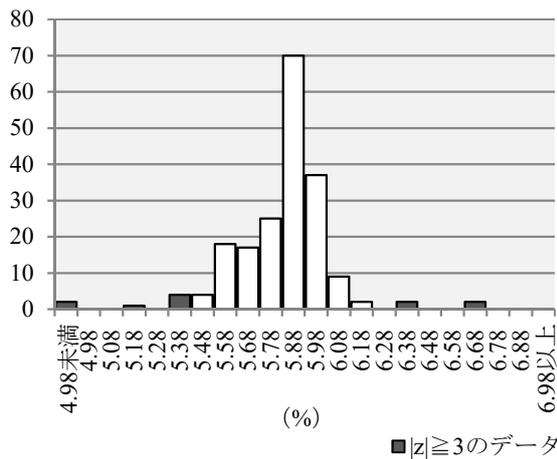
粗たん白質 (A 試料)



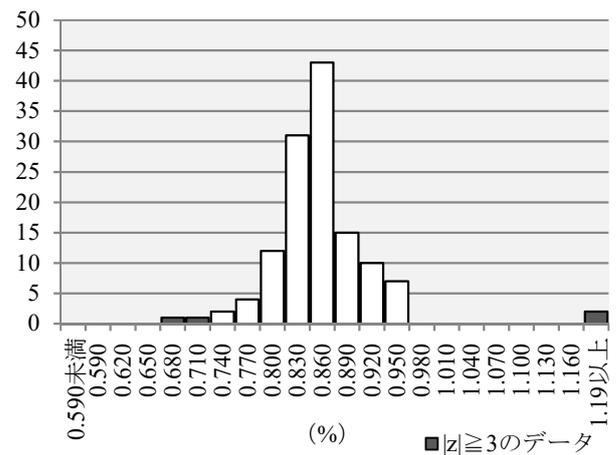
粗脂肪 (A 試料)



粗繊維 (A 試料)

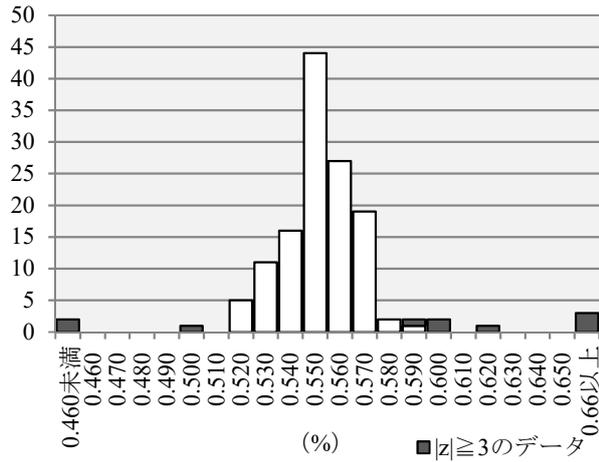


粗灰分 (A 試料)

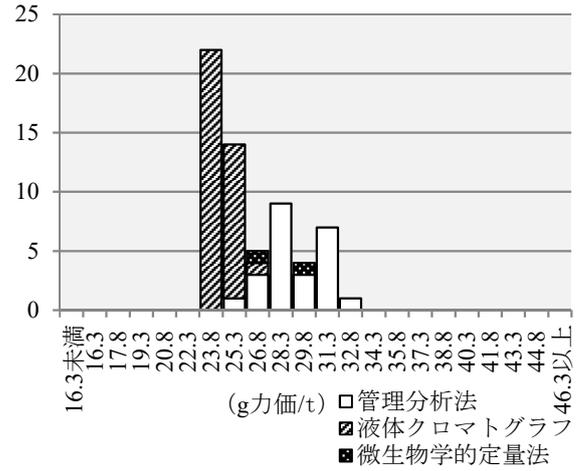


カルシウム (A 試料)

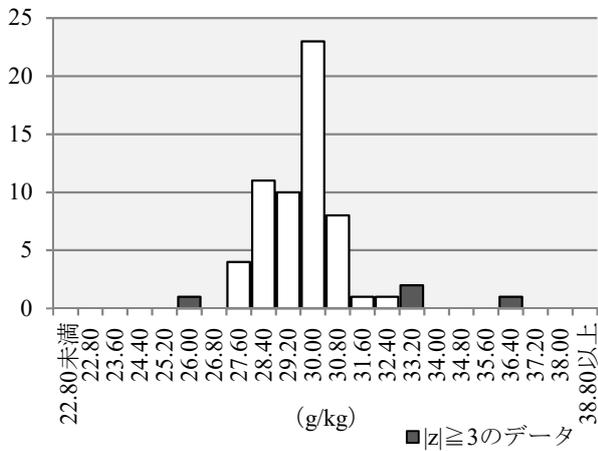
図1 分析成績のヒストグラム (1)



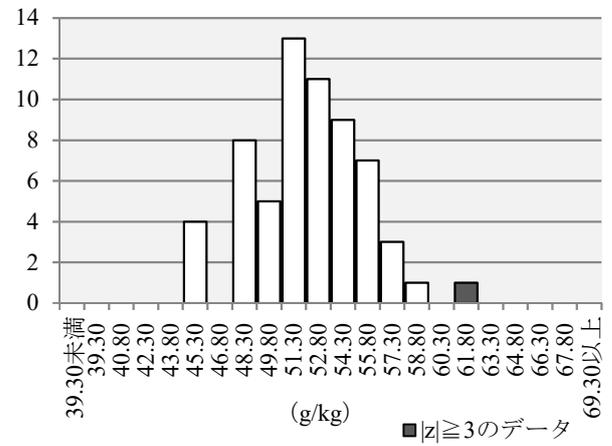
リン (A 試料)



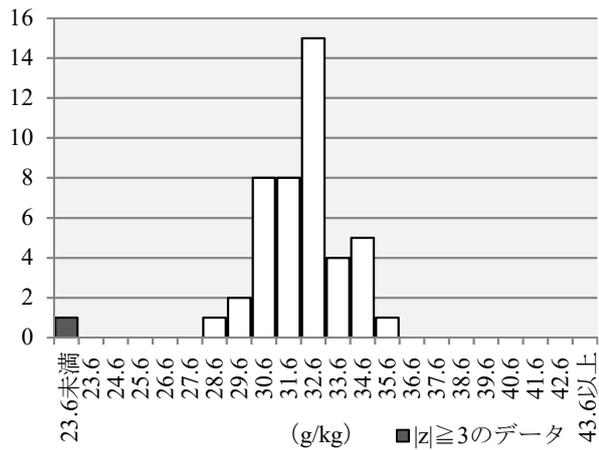
モネンシナトリウム (A 試料)



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 (2)

表 6 A 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	水分 (%)	粗たん白質 (%)	粗脂肪 (%)	粗繊維 (%)	粗灰分 (%)
データ数	198	194	166	112	193
1 中央値	11.82	19.75	3.31	5.91	5.92
1 下限境界値 ^{注2}	11.05	19.06	2.90	4.53	5.48
1 上限境界値	12.59	20.44	3.71	7.28	6.36
2 平均値	11.80	19.76	3.31	5.87	5.89
2 標準偏差	0.25	0.24	0.13	0.42	0.15
2 変動係数 (%)	2.1	1.2	4.0	7.1	2.5
95%信頼区間	11.77~11.84	19.73~19.79	3.29~3.33	5.79~5.95	5.87~5.91

区 分	カルシウム (%)	リン (%)	MN (管理分析法) ^{注3} (g(カ価)/トン)	MN (飼料分析基準) ^{注4} (g(カ価)/トン)
データ数	128	135	24	36
1 中央値	0.870	0.558	29.6	25.2
1 下限境界値 ^{注2}	0.761	0.518	24.8	22.7
1 上限境界値	0.979	0.598	34.4	27.7
2 平均値	0.870	0.557	29.9	25.1
2 標準偏差	0.043	0.014	1.7	0.8
2 変動係数 (%)	4.9	2.5	5.6	3.2
95%信頼区間	0.862~0.877	0.554~0.559	29.2~30.6	24.8~25.4

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。

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を集計した結果である。

表7 D 試料の解析結果

区 分 ^{注1}	銅 (g/kg)	亜鉛 (g/kg)	クエン酸モランテル (g/kg)
データ数	62	62	45
1 中央値	30.12	52.90	32.8
1 下限境界値 ^{注2}	27.06	44.10	28.6
1 上限境界値	33.18	61.70	37.0
2 平均値	29.95	52.80	32.6
2 標準偏差	1.01	3.08	1.5
2 変動係数 (%)	3.4	5.8	4.7
95%信頼区間	29.69~30.21	52.03~53.58	32.19~33.09

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 混合した原料の鑑定成績

原料名	混合割合 (%)	試 験 室				検 出 数	検出率 (%)
		検		出			
		多量 ^{注1}	中量 ^{注2}	少量 ^{注3}	計		
とうもろこし	25	102	7	0	109	0	100
大麦	25	66	28	1	95	14	87
D D G S	10	1	47	14	62	47	57
大豆油かす	10	6	87	8	101	8	93
ごま油かす	10	1	9	12	22	87	20
なたね油かす	10	11	90	7	108	1	99
精白米	3	4	63	35	102	7	94
魚粉	3	0	6	76	82	27	75
炭酸カルシウム	2	0	1	100	101	8	93
食塩	2	0	0	95	95	14	87

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 9 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 ^{注1}	中量 ^{注2}	少量 ^{注3}	計
コーングルテンミール	2	30	12	44
小麦	16	17	3	36
米ぬか油かす	0	15	13	28
りん酸カルシウム	0	0	23	23
ふすま	0	7	8	15
チキンミール	0	0	13	13
ビートパルプ	0	2	7	9
コーングルテンフィード	0	5	3	8
玄米	2	2	2	6
マイロ	0	2	3	5
あまに油かす	0	2	1	3
やし油かす	0	0	3	3
ビールかす	0	0	3	3
肉骨粉	0	0	3	3
アルファルファミール	0	0	2	2
ライ麦	0	1	1	2
麦ぬか	1	0	1	2
えん麦	0	0	1	1
綿実油かす	0	0	1	1
サフラワー油かす	0	0	1	1
小麦粉	0	0	1	1
スクリーニングペレット	0	1	0	1
尿素	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（幼令肉用牛育成・肉用牛肥育用配合飼料）の解析結果

1) 水分

分析値は 198 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 12 件であった。これらを除いた平均値は 11.80 %で、この 95 %信頼区間は 11.77~11.84 %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²⁾では、195 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 11 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 11.80 %、0.24 %及び 2.0 %であった。

その他の方法では 3 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 1 件）の報告があった。

2) 粗たん白質

分析値は 194 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19.76%で、この95%信頼区間は17.73~17.79%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19.53%、0.30%及び1.5%であった。

飼料分析基準・ホウ酸溶液吸収法では、19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19.73%、0.20%及び1.0%であった。

飼料分析基準・燃焼法では、127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19.81%、0.23%及び1.2%であった。

自動分析機による方法では、35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19.63%、0.26%及び1.3%であった。

その他の方法では1件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは0件）の報告があった。

3) 粗脂肪

分析値は166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3.31%で、この95%信頼区間は3.29~3.33%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、95件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは7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3.34%、0.12%及び3.6%であった。

自動分析機による方法では、68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3.27%、0.13%及び4.1%であった。

その他の方法では3件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは1件）の報告があった。

4) 粗繊維

分析値は112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5.87%で、この95%信頼区間は5.79~5.95%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、11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5.62%、0.34%及び6.1%であった。

飼料分析基準・ろ過法では、63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5.73%、0.50%及び8.7%であった。

自動分析機による方法では、33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6.15%、0.21%及び3.5%であった。

その他の方法では5件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは0件）の報告があった。

5) 粗灰分

分析値は193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5.89%で、この95%信頼区間は5.87~5.91%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、190件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは11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 5.90 %、0.14 %及び 2.3 %であった。

その他の方法では 3 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があった。

6) カルシウム

分析値は 128 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 0.870 %で、この 95 %信頼区間は 0.862~0.877 %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、21 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 0.866 %、0.034 %及び 4.0 %であった。

飼料分析基準・原子吸光光度法では、105 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 0.870 %、0.043 %及び 4.9 %であった。

その他の方法では 2 件（うち z -スコアの絶対値が 3 以上のものは 0 件）の報告があった。

7) リン

分析値は 135 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 0.557 %で、この 95 %信頼区間は 0.554~0.559 %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、131 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 0.556 %、0.014 %及び 2.5 %であった。

その他の方法では 4 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。

また本年度は、飼料分析基準の微生物学的定量法による定量値と、飼料分析基準の液体クロマトグラフ法による定量値との差が大きかったことから、これらを別々に集計した。液体クロマトグラフ法においてはモネンシン A 量をモネンシンナトリウム量としているが、今年度の A 試料については、モネンシンナトリウム中のモネンシン A の割合がやや低いことが示唆された。

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 24 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 0 件であった。その平均値は 29.9 g(力価)/トンで、この 95 %信頼区間が 29.2~30.5 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 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 0 件であった。

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、19 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、1.5 g(力価)/トン及び 5.0 %であった。

管理分析法・フローインジェクション法では、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 31.0 g(力価)/トン、1.1 g(力価)/トン及び 3.4 %であった。

飼料分析基準・液体クロマトグラフ法では、36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25.1 g(力価)/トン、0.8 g(力価)/トン及び3.2%であった。

飼料分析基準・微生物学的定量法では、2件の報告があり、報告数が少ないためロバスト法による解析はせず、参考値として平均値を算出した結果、29.0 g(力価)/トンであった。

8.2 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62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29.95 g/kgで、この95%信頼区間は29.69~30.21 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、61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29.94 g/kg、1.02 g/kg及び3.4%であった。

その他の方法では1件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは0件）の報告があった。

2) 亜鉛

分析値は62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。これらを除いた平均値は52.80 g/kgで、この95%信頼区間は52.03~53.58 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、61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52.73 g/kg、3.05 g/kg及び5.8%であった。

その他の方法では1件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは0件）の報告があった。

3) クエン酸モランテル

分析値は45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。これらを除いた平均値は32.6 g/kgで、この95%信頼区間は32.2~33.1 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、44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32.7 g/kg、1.5 g/kg及び4.7%であった。

その他の方法では1件（うち z -スコアの絶対値が3以上のものは0件）の報告があった。

8.5 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。

109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23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25%）は、109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102件、中量が7件、少量が0件であった。

大麦（混合割合25%）は、95件（検出率87%）の報告があり、その内訳は多量が66件、中量が28件、少量が1件であった。

DDGS（混合割合10%）は、62件（検出率57%）の報告があり、その内訳は多量が1件、中量が47件、少量が14件であった。

大豆油かす（混合割合10%）は、101件（検出率93%）の報告があり、その内訳は多量が6

件、中量が 87 件、少量が 8 件であった。

ごま油かす（混合割合 10 %）は、22 件（検出率 20 %）の報告があり、その内訳は多量が 1 件、中量が 9 件、少量が 12 件であった。

なたね油かす（混合割合 10 %）は、108 件（検出率 99 %）の報告があり、その内訳は多量が 11 件、中量が 90 件、少量が 7 件であった。

精白米（混合割合 3 %）は、102 件（検出率 94 %）の報告があり、その内訳は多量が 4 件、中量が 63 件、少量が 35 件であった。

魚粉（混合割合 3 %）は、82 件（検出率 75 %）の報告があり、その内訳は多量が 0 件、中量が 6 件、少量が 76 件であった。

炭酸カルシウム（混合割合 2 %）は、101 件（検出率 93 %）の報告があり、その内訳は多量が 0 件、中量が 1 件、少量が 100 件であった。

食塩（混合割合 2 %）は、95 件（検出率 87 %）の報告があり、その内訳は多量が 0 件、中量が 0 件、少量が 95 件であった。

誤って検出された原料としては、コーングルテンミールが最も多く、44 件の報告があった。次いで、小麦が 36 件、米ぬか油かすが 28 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).
- 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).

(参考)

令和4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…幼令肉用牛育成・肉用牛肥育用配合飼料

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

※ B試料（魚粉）の分析は，今年度は実施しません。

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

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）に定める方法並びに「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」（昭和63年5月11日付け63畜B第996号農林水産省畜産局長通知）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60年10月15日付け60畜B第2928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牛用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，必ず今年度の報告書様式（Microsoft Excel形式，入手方法は5（1）参照．）にて，報告してください。

(3) 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。

(4) 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，該当部分のみ記入した報告書を別途作成していただき，ご報告ください。

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、独立行政法人農林水産消費安全技術センターホームページ

(http://www.famic.go.jp/ffis/feed/sub2_teawase.html) より「令和4年度飼料等の共通試料による分析鑑定結果報告書」をダウンロードしてMicrosoft Excel上で記入し、報告してください。

(2) 試料番号はA, C及びD試料でそれぞれ異なりますので、分析結果を報告する試料についてそれぞれ記入してください。(結果とりまとめ時はA試料の試料番号を試験室番号としますので、A試料の試料番号については分析を行わない場合も必ず記入してください。)

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、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、モネンシナトリウム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、備考欄に該当番号を記入し、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、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。

粗灰分について、灰化温度を記入してください。

(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)から選択してください。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、該当する番号を選択してください。(複数回答される場合やその他を選択された場合、番号欄右枠(補足欄)に記入してください。)

(4) 分析の一部を別の試験室等で実施した場合は、実施した試験室名と分析項目を報告書の(5)の欄もしくは報告時のメール本文に記載してください。

(5) 令和4年9月30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メールアドレスに送付してください。報告書のファイル名は試験室番号(A試料の番号) __試験室名としてくだ

さい。（例：試験室番号1番FAMIC本部の場合：「1__FAMIC本部」）

複数の報告書を提出される場合は、ファイル名の末尾に全体数ができるように番号を付けてください。（例：計2つの報告書を提出する場合、1-2と2-2など）

報告メールの件名は「令和4年度手合わせ分析結果報告__試験室名」としてください。

メールの容量は添付ファイルを含めて必ず合計10MB以下にしてください。

提出済みの報告書に訂正等がある場合は件名に【再提出】と入れたメールもしくは電話で確実に担当者へご連絡ください。

正しく受信できた場合、10月1日までに受信確認メールを返信いたします。（締切日直前に提出された場合、多少返信が遅れる可能性もございますがご了承ください。）

提出した報告書ファイルは受信確認メールが届くまで破棄しないでください。

メールでの報告書提出が難しい場合は担当者までご連絡ください。

表省略

令和4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
 MAIL
 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	 %	分析法	1 飼料分析基準 2 その他の方法
粗たん白質	 %	分析法	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	 %	分析法	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	 %	分析法	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	 %	分析法	1 飼料分析基準 灰化温度 °C 2 その他の方法
カルシウム	 %	分析法	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	 %	分析法	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(カ価)/ト	分析法	1 迅速定量法 2 迅速定量法 (フローインジェクション装置使用) 3 飼料分析基準 (液体クロマトグラフ法) LC メーカー/型式 検出器 メーカー/型式 カラム メーカー/型式 内径(mm) 長さ(mm) 粒径(μm) 4 飼料分析基準 (微生物学的定量法)

(2) D試料 分析結果

試料番号

分析成分名	分析値	備考	
銅	g/kg	分析法	1 飼料分析基準 2 その他の方法
亜鉛	g/kg	分析法	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	分析法	1 飼料分析基準 測定条件 LC メーカー/型式 検出器 メーカー/型式 カラム メーカー/型式 内径(mm) 粒径(μm) 2 その他の方法

(3) C試料 鑑定結果

試料番号

検出原料名	混合割合	検出方法	補足

混合割合
下から選択
多量 (15%以上)
中量 (5%以上15%未満)
少量 (1%以上5%未満)

検出方法
下から番号を選択
その他の場合補足を記入
1 肉眼
2 酸処理
3 アルカリ処理
4 その他

注) 10種類の原料を混合しています。各セルの検出原料名のリストから選択してください。

検出原料名			
下表から選択			
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
米ぬか油かす	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	DDGS	肉骨粉	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	食塩	炭酸カルシウム	りん酸カルシウム

(4) 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。(メール本文でも可)

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（令和4年度）****Monitoring Results of Undesirable Substances in Feeds (in the Fiscal Year 2022)**

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

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、農林水産省が毎年定めている「食品の安全性に関する有害化学物質のサーベイランス・モニタリング年次計画」等に基づき、法令等で定められている基準値等の適合状況のモニタリング及び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、令和4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**

令和4年4月から令和5年3月までの間に、農林水産省（地方農政局等）が飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律¹⁾（以下「飼料安全法」という。）第56条の規定に基づき、港湾サイロに対して立入検査を実施した際に収去した飼料、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、配混合飼料工場等に対して立入検査を実施した際に採取した飼料等並びにサーベイランスに協力いただいた飼料製造事業場において採取した飼料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

飼料安全法第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²⁾（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。）が定められている。また、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準³⁾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。各試料に対するモニタリング等実施成分は、これらの基準値の他、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て以下のとおり選定した。

1) 有害物質**i かび毒（24成分）****ア 指導基準値等が定められているもの（4成分）**

とうもろこし又は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 B₁, ゼアラレノン, デオキシニバレノール及びフモニシン (B₁, B₂ 及び B₃ の総和, 以下同じ.) を対象とした.

イ ア以外のかび毒等 (20 成分)

飼料分析基準⁴⁾に方法が規定されている以下のかび毒 20 成分を対象とした.

かび毒 : アフラトキシン B₂, G₁, G₂, 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, ジアセトキシシルペノール, デオキシニバレノール-3-グルコシド, オクラトキシン A, シトリニン, α -ゼアララノール, β -ゼアララノール, ゼアララノン, α -ゼアラレノール及び β -ゼアラレノール

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, 鉛及びヒ素を対象とした.

iii 農薬 (123 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 34 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 89 成分を対象とした.

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

モニタリング等の対象試料		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	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				
種類	試料点数								
	中すう育成用配合飼料	1		1					1
	大すう育成用配合飼料	1	1		1				1
	成鶏飼育用配合飼料	29	28	6	5				4
	ブロイラー肥育前期用配合飼料	2	2						
	ブロイラー肥育後期用配合飼料	5	3	1	2				1
	卵用種鶏飼育用配合飼料	1	1	1					
	鶏複数ステージ用（幼すう用またはブロイラー前期用を含むもの）	1	1						
	鶏複数ステージ用（幼すう用、ブロイラー前期用を含まないもの）	1		1	1				1
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	7	5		2				
	子豚育成用配合飼料	4	4	1	1				1
	肉豚肥育用配合飼料	15	12	5	5				1
	種豚飼育用配合飼料	7	7						1
	豚複数ステージ用（ほ乳期子豚用を含まないもの）	4	4	1					
配 混 合 飼 料	ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料	1				1			
	ほ乳期子牛育成用配合飼料	3	3		1	1	1	1	1
	若令牛育成用配合飼料	8	4	1	2	6	6	6	2
	乳用牛飼育用配合飼料	7	4	3	2	6	6	6	3
	幼令肉用牛育成用配合飼料	1	1						
	肉用牛肥育用配合飼料	19	14	2	1	9	9	9	2
	肉牛繁殖用配合飼料	6	2	1		4	4	4	1
	牛複数ステージ用（ほ乳期子牛用を含み、乳用牛用を含まないもの）	1	1						
	牛複数ステージ用（乳用牛用を含み、ほ乳期子牛用を含まないもの）	1	1			1	1	1	1
	牛複数ステージ用（ほ乳期子牛用、乳用牛用を含まないもの）	1	1						
	養殖水産動物用配合飼料	32		32					
	圧ぺんとうもろこし・アルファルファ二種混合飼料	1	1	1	1	1	1	1	1
	動物性たん白質混合飼料	2				2	2	2	2
	糖蜜吸着飼料	1				1	1	1	1
	上記以外の混合飼料	18	3	1	3	18	18	18	6
	小計	180	103	58	27	50	49	49	31
穀 類	圧ぺん大麦	1	1						
	大麦	3	3						
	グレインソルガム（マイロ）	4	4		4				
	小麦	2	2						
	とうもろこし	48	48		48				
	粳米（もみ米サイレージ）	1				1	1	1	
	小計	59	58		52	1	1	1	
そ う こ う 類	米ぬか	5	5						
	米ぬか油かす	7	7						1
	コーングルテンフィード	44	44						
	とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル（DDGS）	7	7						
	ビールかす	2	2						
	ふすま	10	10						
	麦ぬか	2	2						
小計	77	77						1	

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		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	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				
種類	試料点数								
植物性油かす類	コーングルテンミール	28	28						
	大豆油かす	8	8						
	なたね油かす	8	7						1
	小計	44	43						1
動物質性飼料	イカ乾燥物	1				1	1	1	
	イカ内臓溶解液	1				1	1	1	
	チキンミール	24				24	24	24	16
	フェザーミール	11				11	11	11	1
	ホタテ抽出物	1				1	1	1	
	ホタテ内臓粉末飼料	1				1	1	1	1
	魚粉	63		36		34	34	34	27
	原料混合肉骨粉	21		1			21	21	14
	蒸製骨粉	1					1	1	
	肉骨粉	3					3	3	1
小計	127		37		73	98	98	60	
乾牧草	アルファルファ	3		3	3				
	オーツヘイ	1		1	1				
	クレイングラス	2		2	2				
	スーダングラス	1		1	1				
	チモシー	2		2	2				
小計	9		9	9					
その他	飼料用酵母	1				1	1	1	
	動物性油脂	53							53
	特定動物性油脂	1							1
	綿実	6	6						
小計	61	6			1	1	1	54	
合計	557	287	104	88	125	149	149	54	93

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⁵⁾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⁶⁾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⁷⁾の試料採取方法に準拠した次の方法⁸⁾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

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。

i~iii の試験方法の定量下限、検出下限及び回収率は飼料分析基準に記載されている。

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⁹⁾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 比重選別及び 1.2 顕微鏡検査を応用した鑑定方法¹⁰⁾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

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。魚粉等、チキンミール等、肉骨粉等及び輸入飼料は、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。

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。

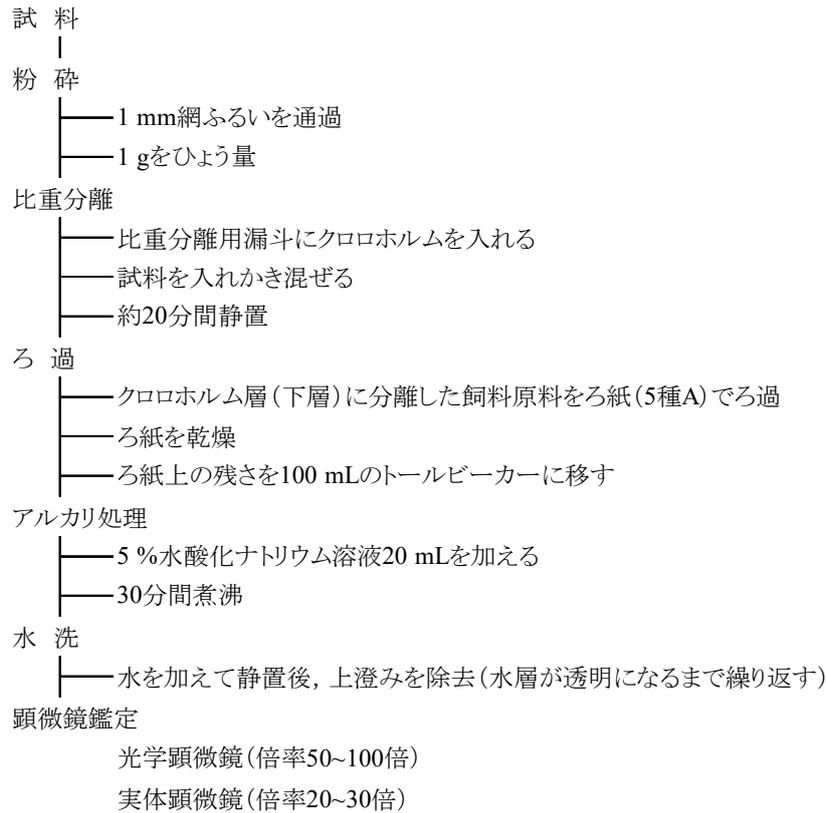


図1 試料中の肉骨粉等の顕微鏡鑑定方法

3 結果

3.1 有害物質

有害物質のモニタリング等の結果について、省令基準値及び指導基準値等の有無によりそれぞれ取りまとめた。

1) かび毒

配混合飼料 103 点，単体飼料 184 点について，指導基準値等が定められているアフラトキシン B₁，ゼアラレノン，デオキシニバレノール及びフモニシンの 4 成分のモニタリング及びサーベイランス，並びに指導基準値等が定められていないかび毒 20 成分のサーベイランスを実施した。指導基準値等が定められている 4 成分の結果を表 2-1 に，指導基準値等が定められていない 20 成分の結果を表 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 B₁

配混合飼料 102 点中 20 点から検出され（検出率 20%），最大値は 0.004 mg/kg，検出されたものの平均値（以下同様）は 0.001 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 48 点中 17 点から検出され（検出率 35%），最大値は 0.018 mg/kg，平均値は 0.003 mg/kg であり，管理基準値（0.02 mg/kg）を超えるものはなかった。

ii ゼアラレノン

配混合飼料 102 点中 100 点から検出され（検出率 98 %），最大値は 0.19 mg/kg，平均値は 0.032 mg/kg であり，管理基準値（家畜及び家きんに給与される配合飼料で 0.5 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 48 点中 45 点から検出され（検出率 94 %），最大値は 0.12 mg/kg，平均値は 0.028 mg/kg であった。マイロの 1 点で定量値が高いものがあり，その値は 1.9 mg/kg であった。また，とうもろこしの加工副産物の一部も定量値が高く，コーングルテンフィードの平均値は 0.24 mg/kg（最大値 1.8 mg/kg），DDGS の平均値は 0.18 mg/kg（最大値 0.34 mg/kg）及びコーングルテンミールの平均値は 0.43 mg/kg（最大値 1.8 mg/kg）であった。

iii デオキシニバレノール

配混合飼料 103 点中 84 点から検出され（検出率 82 %），最大値は 0.86 mg/kg，平均値は 0.25 mg/kg であり，管理基準値（反すう動物（ほ乳期のものを除く。）に給与される配合飼料は 3 mg/kg，家畜（反すう動物（ほ乳期のものを除く。）を除く。）及び家きんに給与される飼料は 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 48 点中 37 点から検出され（検出率 77 %），最大値は 0.69 mg/kg，平均値は 0.23 mg/kg であった。小麦の 1 点で定量値が高いものがあり，その値は 1.3 mg/kg であった。また，とうもろこしの加工副産物の一部も定量値が高く，コーングルテンフィードの平均値は 2.9 mg/kg（最大値 13 mg/kg），DDGS の平均値は 2.2 mg/kg（最大値 4.2 mg/kg）及びコーングルテンミールの平均値は 0.18 mg/kg（最大値 1.4 mg/kg）であった。

iv フモニシン

配混合飼料 103 点全てから検出され，最大値は 1.6 mg/kg，平均値は 0.44 mg/kg であり，管理基準値（家畜及び家きんに給与される配合飼料は 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，とうもろこしは 35 点全てから検出され，最大値は 2.5 mg/kg，平均値は 0.61 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が高いものがあり，コーングルテンミールの平均値は 1.4 mg/kg（最大値 8.7 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及びサーベイランスの結果

モニタリング等の 対象試料	アフラトキシンB ₁ (検出下限 ²⁾ 0.0003 mg/kg)						ゼアラレノン (検出下限 ²⁾ 0.0003 mg/kg)					
	指導/管理 基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			管理 基準値 (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)	点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
(アフラトキシンB ₁ のみ) 配合飼料（乳用牛用）	指 0.01	7	0	0								
配混合飼料 （表外 ¹⁾ に示す飼料）	管 0.01	10	4	40	0.004	0.002	0.5	102	100	98	0.19	0.032
配混合飼料 （上記以外の配合飼料）	管 0.02	85	16	19	0.003	0.001						
全配混合飼料		102	20	20	0.004	0.001		102	100	98	0.19	0.032
圧ぺん大麦	—	1	0	0			—	1	1	100	0.0004	0.0004
大麦	—	3	0	0			—	3	1	33	0.15	0.15
グレイソルガム（マイロ）	—	4	1	25	0.0007	0.0007	—	4	3	75	1.9	0.63
小麦	—	2	0	0			—	2	1	50	0.082	0.082
とうもろこし	管 0.02	48	17	35	0.018	0.003	—	48	45	94	0.12	0.028
米ぬか	—						—					
米ぬか油かす	—	7	0	0			—	7	6	86	0.012	0.005
コーングルテンフィード	—						—	44	43	98	1.8	0.24
DDGS	—	7	0	0			—	6	6	100	0.34	0.18
ビールかす	—						—					
ふすま	—	10	0	0			—	10	8	80	0.012	0.004
麦ぬか	—						—					
コーングルテンミール	—						—	28	28	100	1.8	0.43
大豆油かす	—	8	0	0			—	8	8	100	0.015	0.008
なたね油かす	—						—					
綿実	—						—					
計		192	38	20				263	250	95		

1) 該当する配混合飼料の種類は以下のとおり。

アフラトキシン B₁：幼すう用，ブロイラー肥育前期用，ほ乳期子豚用及びほ乳期子牛用
ゼアラレノン：家畜及び家きん用

2) 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。

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及びサーベイランスの結果（続き）

	デオキシニバレノール (検出下限 ²⁾ 0.003 mg/kg)						フモニシン (B ₁ +B ₂ +B ₃) (検出下限 0.0006 mg/kg)					
	管理 基準値 (mg/kg)	試料 点数	うち検出されたもの			管理 基準値 (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)	点数	検出率 (%)	最大値 (mg/kg)	平均値 (mg/kg)
(アフラトキシンB ₁ のみ)												
配合飼料（乳用牛用）												
配混合飼料 （表外 ¹⁾ に示す飼料）	3	76	60	79	0.77	0.20	4	103	103	100	1.6	0.44
配混合飼料 （上記以外の配合飼料）	1	27	24	89	0.86	0.38						
全配混合飼料		103	84	82	0.86	0.25		103	103	100	1.6	0.44
圧ぺん大麦	—	1	0	0			—					
大麦	—	3	3	100	0.028	0.019	—					
グレイソルガム(マイロ)	—	4	1	25	0.049	0.049						
小麦	—	2	1	50	1.3	1.3						
とうもろこし	—	48	37	77	0.69	0.23	—	35	35	100	2.5	0.61
米ぬか	—	5	3	60	0.064	0.029	—					
米ぬか油かす	—	5	5	100	0.024	0.018	—					
コーングルテンフィード	—	44	44	100	13	2.9	—	44	44	100	1.0	0.18
DDGS	—	7	7	100	4.2	2.2	—					
ビールかす	—	2	0	0			—					
ふすま	—	10	7	70	0.24	0.13	—	1	1	100	0.010	0.010
麦ぬか	—	2	2	100	0.067	0.044	—					
コーングルテンミール	—	27	27	100	1.4	0.18	—	28	28	100	8.7	1.4
大豆油かす	—	8	4	50	0.034	0.021	—					
なたね油かす	—	7	1	14	0.011	0.011	—					
綿実	—	6	6	100	0.44	0.098	—					
計		284	232	82				211	211	100		

1) 該当する配混合飼料の種類は以下のとおり。

デオキシニバレノール：反すう動物（ほ乳期のものを除く。）用

フモニシン：家畜及び家きん用

2) 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。

表 2-2 指導基準値等が定められていないかび毒のサーベイランスの結果

サーベイランスの対象成分	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 ₂	0.0003	192	7	4	0.002	0.0007
アフラトキシンG ₁	0.0003	192	8	4	0.011	0.003
アフラトキシンG ₂	0.0003	192	2	1	0.0005	0.0005
ステリグマトシスチン	0.0003	223	64	29	0.006	0.001
HT-2トキシン	0.002	263	60	23	0.062	0.015
T-2トキシン	0.002	284	105	37	0.097	0.010
ネオソラニオール	0.002	284	6	2	0.005	0.004
フザレノン-X	0.003	284	2	0.7	0.029	0.029
3-アセチルデオキシニバレノール	0.006	263	11	4	0.37	0.063
15-アセチルデオキシニバレノール	0.006	263	113	43	3.2	0.20
ニバレノール	0.002	284	80	28	0.39	0.061
ジアセトキシシルペノール	0.002	263	6	2	0.020	0.006
デオキシニバレノール-3-グルコシド	0.002	263	186	71	0.93	0.095
オクラトキシンA	0.0003	255	32	13	0.013	0.001
シトリニン	0.002	255	57	22	0.10	0.012
α-ゼアララノール	0.002	213	1	0.5	0.004	0.004
β-ゼアララノール	0.002	213	0	0		
ゼアララノン	0.002	213	33	15	0.042	0.008
α-ゼアラレノール	0.003	213	12	6	0.023	0.007
β-ゼアラレノール	0.003	213	37	17	0.077	0.008

*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

配混合飼料（養殖水産動物用を除く）23点、乾牧草等9点、魚粉等（魚粉及び肉骨粉）37点及び養殖水産動物用配合飼料32点について、管理基準値が定められている重金属等4成分のモニタリング及びサーベイランスを実施した。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

養殖水産動物用を除く配混合飼料23点中6点から検出され（検出率26%）、最大値は0.28 mg/kg、平均値は0.09 mg/kgであり、管理基準値（0.8 mg/kg）を超えるものはなかった。

乾牧草等9点中2点から検出され（検出率22%）、最大値は0.24 mg/kg、平均値は0.14 mg/kgであり、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36点中35点から検出され（検出率97%）、最大値は1.6 mg/kg、平均値は0.60 mg/kgであった。肉骨粉1点の測定値は0.05 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。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では32点全てから検出され、最大値は1.0 mg/kg、平均値は0.43 mg/kgであった。

ii 水銀

養殖水産動物用を除く配混合飼料 23 点中 13 点から検出され（検出率 57 %），最大値は 0.10 mg/kg，平均値は 0.03 mg/kg であり，管理基準値（0.2 mg/kg）を超えるものはなかった。

乾牧草等 9 点中 8 点から検出され（検出率 89 %），最大値は 0.06 mg/kg，平均値は 0.04 mg/kg であり，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 36 点全てから検出され，最大値は 0.73 mg/kg，平均値は 0.21 mg/kg であった。肉骨粉 1 点の測定値は 0.05 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。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では 32 点中 31 点から検出され（検出率 97 %），最大値は 0.45 mg/kg，平均値は 0.16 mg/kg であった。

iii 鉛

養殖水産動物用を除く配混合飼料 23 点中 1 点から検出され（検出率 4 %），その値は 1.3 mg/kg であり，管理基準値（2 mg/kg）を超えるものはなかった。

乾牧草等 9 点中 1 点からは検出され（検出率 11 %），その値は 0.2 mg/kg であり，管理基準（3 mg/kg）を超えるものはなかった。

動物質性飼料では，魚粉 36 点中 13 点から検出され（検出率 36 %），最大値は 5.4 mg/kg，平均値は 1.5 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（7 mg/kg）を超えるものはなかった。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では 32 点中 8 点から検出され（検出率 25 %），最大値は 0.5 mg/kg，平均値は 0.4 mg/kg であった。

iv ひ素

養殖水産動物用を除く配混合飼料 23 点中 10 点から検出され（検出率 43 %），最大値は 0.89 mg/kg，平均値は 0.20 mg/kg であった。稲わらを除く乾牧草等 9 点中 4 点から検出され（検出率 44 %），最大値は 0.45 mg/kg，平均値は 0.19 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。

動物質性飼料では，魚粉では 36 点全てから検出され，最大値は 11 mg/kg，平均値は 4.7 mg/kg であり，管理基準値（15 mg/kg）を超えるものはなかった。肉骨粉 1 点からは検出されなかった。

サーベイランスとして実施した養殖水産動物用配合飼料では 32 点全てから検出され，最大値は 5.0 mg/kg，平均値は 2.5 mg/kg であった。

表3 重金属等のモニタリング及びサーベイランスの結果

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	0.8	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	23	6	26	0.28	0.09	0.03
	1	乾牧草等	9	2	22	0.24	0.14	
	3	魚粉	36	35	97	1.6	0.60	
		肉骨粉	1	1	100	0.05	0.05	
	—	養殖水産動物用配合飼料	32	32	100	1.0	0.43	
		総計	101	76	75	1.6	0.47	
水銀	0.2	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	23	13	57	0.10	0.03	0.01
	0.4	乾牧草等	9	8	89	0.06	0.04	
	1	魚粉	36	36	100	0.73	0.21	
		肉骨粉	1	1	100	0.05	0.05	
	—	養殖水産動物用配合飼料	32	31	97	0.45	0.16	
		総計	101	89	88	0.73	0.15	
鉛	2	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	23	1	4	1.3	1.3	0.2
	3	乾牧草等	9	1	11	0.2	0.2	
	7	魚粉	36	13	36	5.4	1.5	
		肉骨粉	1	0	0			
	—	養殖水産動物用配合飼料	32	8	25	0.5	0.4	
		総計	101	23	23	5.4	1.0	
ひ素	2	配混合飼料（養殖水産動物用を除く）	23	10	43	0.89	0.20	0.05
		乾牧草等（稲わらを除く）	9	4	44	0.45	0.19	
	15	魚粉	36	36	100	11	4.7	
	7	肉骨粉	1	0	0			
	—	養殖水産動物用配合飼料	32	32	100	5.0	2.5	
		総計	101	82	81	11	3.1	

3) 農薬

配混合飼料 27 点，穀類（とうもろこし及びマイロ）52 点及び乾牧草等 9 点について，省令基準値が定められている農薬 34 成分及び省令基準値が定められていない農薬 89 成分の計 123 成分についてモニタリング及びサーベイランスを実施した。省令基準値が定められている 34 成分の結果を表 4 に，省令基準値が定められていない 89 成分の結果を表 5 に示した。

省令基準値を超過して検出されたものはなかったが，とうもろこしを中心に有機リン系農薬で検出が散見された。結果の概要は以下のとおりであった。

i 有機リン系農薬

省令基準値が定められているクロルピリホスメチル，ピリミホスメチル，フェントロチオン及びマラチオンが主にとうもろこしから検出された。とうもろこしからの検出率は，ピリミホスメチル 31%，フェントロチオン 11%の順であった。

ii その他の検出された農薬

省令基準値が定められているペンディメタリンについて牧草 1 点から検出された。また，省令基準値が定められていない農薬については，プロピコナゾールが牧草 1 点から検出された。

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（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	17	0	0			
	配混合飼料（牛等用）	0.4	10	0	0			
	牧草	0.4	9	0	0			0.005
	基準値のない飼料	—	39	0	0			
	計	—	75	0	0			
BHC	配混合飼料	0.005	27	0	0			
	牧草	0.02	9	0	0			0.005
	基準値のない飼料	—	39	0	0			
	計	—	75	0	0			
DDT	配混合飼料	0.1	27	0	0			
	牧草	0.1	9	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	39	0	0			
	計	—	75	0	0			
アトラジン	とうもろこし	0.2	35	0	0			
	マイロ	0.02	4	0	0			
	牧草	15	9	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	27	0	0			
	計	—	75	0	0			
アラクロール	とうもろこし	0.02	35	0	0			
	マイロ	0.05	4	0	0			
	牧草	0.05	9	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	27	0	0			
	計	—	75	0	0			
アルドリン及び ディルドリン	配混合飼料	0.02	27	0	0			
	牧草	0.02	9	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	39	0	0			
	計	—	75	0	0			
イソフェンホス	とうもろこし	0.02	35	0	0			
	基準値のない飼料	—	40	0	0			0.02
	計	—	75	0	0			
エチオン	牧草	20	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	66	0	0			0.02
	計	—	75	0	0			
エンドリン	配混合飼料	0.01	27	0	0			
	牧草	0.01	9	0	0			0.01
	基準値のない飼料	—	39	0	0			
	計	—	75	0	0			
グルホシネート	とうもろこし	0.1	13	0	0			0.02
クロルピリホス	とうもろこし	0.1	35	0	0			
	マイロ	0.75	4	0	0			
	牧草	13	9	0	0			0.01
	基準値のない飼料	—	27	0	0			
	計	—	75	0	0			
クロルピリホスメチル	とうもろこし	7	35	0	0			
	マイロ	10	4	1	25	0.51	0.51	0.02
	基準値のない飼料	—	36	0	0			
	計	—	75	1	1	0.51	0.51	

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（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)	
クロルフェンビンホス	とうもろこし	0.05	35	0	0			
	基準値のない飼料	—	40	0	0			0.02
	計	—	75	0	0			
クロルプロファム	とうもろこし	0.05	35	0	0			
	基準値のない飼料	—	40	0	0			0.02
	計	—	75	0	0			
クロルベンジレート	とうもろこし	0.02	35	0	0			
	基準値のない飼料	—	40	0	0			0.02
	計	—	75	0	0			
シハロトリン	とうもろこし	0.04	35	0	0			
	マイロ	0.2	4	0	0			
	牧草	0.6	9	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	27	0	0			
	計	—	75	0	0			
ジメトエート	とうもろこし	1	35	0	0			
	マイロ	0.2	4	0	0			
	牧草	2	9	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	27	0	0			
	計	—	75	0	0			
ダイアジノン	とうもろこし	0.02	35	0	0			
	マイロ	0.1	4	0	0			
	牧草	10	9	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	27	0	0			
	計	—	75	0	0			
デルタメトリン及びトラロメトリン	とうもろこし	1	35	0	0			0.03
	マイロ	1	4	0	0			0.03
	牧草	5	9	0	0			0.045
	基準値のない飼料	—	27	0	0			0.03
	計	—	75	0	0			
テルブホス	とうもろこし	0.01	35	0	0			
	マイロ	0.05	4	0	0			
	牧草	1	9	0	0			0.005
	基準値のない飼料	—	27	0	0			
	計	—	75	0	0			
パラチオン	とうもろこし	0.3	35	0	0			
	マイロ	0.08	4	0	0			
	牧草	5	9	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	27	0	0			
	計	—	75	0	0			
ピリミホスメチル	とうもろこし	1	35	11	31	0.26	0.12	
	マイロ	1	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	10	28	0.81	0.15	0.02
	計	—	75	21	28	0.81	0.13	
フィプロニル	とうもろこし	0.02	35	0	0			
	マイロ	0.01	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	0	0			0.003
	計	—	75	0	0			
フェニトロチオン	とうもろこし	1	35	4	11	0.08	0.05	
	マイロ	1	4	0	0			
	牧草	10	9	0	0			0.02
	基準値のない飼料	—	27	1	4	0.44	0.44	
	計	—	75	5	7	0.44	0.13	

表4 農薬のモニタリング及びサーベイランスの結果（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)
フェントエート	とうもろこし	0.4	35	0	0		0.02	
	マイロ	0.4	4	0	0			
	基準値のない飼料	—	36	0	0			
	計	—	75	0	0			
フェンバレレート	配混合飼料（鶏・うずら用）	0.5	9	0	0		0.02	
	配混合飼料（豚用）	4	8	0	0			
	配混合飼料（牛等用）	8	10	0	0			
	牧草	13	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	39	0	0			
	計	—	75	0	0			
フェンプロパトリン	牧草	20	9	0	0		0.02	
	基準値のない飼料	—	66	0	0			
	計	—	75	0	0			
ヘプタクロル	配混合飼料	0.02	27	0	0		0.02	
	牧草	0.02	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	39	0	0			
	計	—	75	0	0			
ペルメトリン	とうもろこし	2	35	0	0		0.02	
	マイロ	2	4	0	0			
	牧草	55	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	27	0	0			
	計	—	75	0	0			
ペンディメタリン	とうもろこし	0.2	35	0	0		0.02	
	マイロ	0.1	4	0	0			
	牧草	15	9	1	11	0.08		0.08
	基準値のない飼料	—	27	0	0			
	計	—	75	1	1	0.08		0.08
ホスメット	とうもろこし	0.05	35	0	0		0.02	
	マイロ	0.05	4	0	0			
	牧草	40	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	27	0	0			
	計	—	75	0	0			
ホレート	とうもろこし	0.05	35	0	0		0.02	
	マイロ	0.05	4	0	0			
	牧草	1.5	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	27	0	0			
	計	—	75	0	0			
マラチオン	とうもろこし	2	35	0	0		0.02	
	マイロ	2	4	0	0			
	牧草	135	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	27	2	7	0.13		0.08
	計	—	75	2	3	0.13		0.08
メチダチオン	とうもろこし	0.1	35	0	0		0.02	
	マイロ	0.2	4	0	0			
	牧草	12	9	0	0			
	基準値のない飼料	—	27	0	0			
	計	—	75	0	0			

表5 農薬のサーベイランスの結果 (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)	検出平均値 (mg/kg)	検出最大値 (mg/kg)	検出率 (%)	試験点数	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)	検出平均値 (mg/kg)	検出最大値 (mg/kg)	検出率 (%)	試験点数	
	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)						
EPN	75	0	0	0	0.02				75	シラフルオフェン	75	0	0	0	0.02				75	フラムプロップメチル
アセトクロール	75	0	0	0	0.02				75	ターバシル	75	0	0	0	0.02				75	フルントリネート
アニロホス	75	0	0	0	0.02				75	チオベンカルブ	75	0	0	0	0.02				75	フルトラニル
アメトリン	75	0	0	0	0.02				75	テクナゼン	75	0	0	0	0.02				75	フルトリアホール
アリドクロール	75	0	0	0	0.02				75	テトラクロロピリンホス	75	0	0	0	0.02				75	フルバリネート
アレスリン	75	0	0	0	0.02				75	テトラコナゾール	75	0	0	0	0.02				75	フルミオキサジン
イサゾホス	75	0	0	0	0.02				75	テトラジホシ	75	0	0	0	0.02				75	フルミクロラックベンチル
イソプロチオラン	75	0	0	0	0.02				75	テブコナゾール	75	0	0	0	0.02				75	プロシミドン
イプロベンホス	75	0	0	0	0.02				75	テブフェンピラド	75	0	0	0	0.02				75	プロバクロール
エタルフルラリン	75	0	0	0	0.02				75	テフルトリン	75	0	0	0	0.02				75	プロバジン
エディフェンホス	75	0	0	0	0.02				75	テルブトリン	75	0	0	0	0.02				75	プロバニル
エトフェンプロックス	75	0	0	0	0.02				75	トリアジメホシ	75	0	0	0	0.02				75	プロバルギッド
エトフメセート	75	0	0	0	0.02				75	トリアレート	75	0	0	0	0.02				75	プロビコナゾール
エトプロホス	75	0	0	0	0.02				75	トリフルラリン	75	0	0	0	0.02				75	プロフアム
エトリジアゾール	75	0	0	0	0.02				75	トリフロキシストロピン	75	0	0	0	0.02				75	プロフェノホス
エトリムホス	75	0	0	0	0.02				75	ナプロバミド	75	0	0	0	0.02				75	プロベタンホス
オキサジアゾン	75	0	0	0	0.02				75	バラチオンメチル	75	0	0	0	0.02				75	プロモゾチド
カズホホス	75	0	0	0	0.02				75	ハルフェンプロックス	75	0	0	0	0.02				75	プロモプロピレート
カルフェントラゾエチル	75	0	0	0	0.02				75	ピフェントリン	75	0	0	0	0.02				75	プロモホス
キントゼン	75	0	0	0	0.02				75	ピペロホス	75	0	0	0	0.02				75	ヘキサコナゾール
クレゾキシムメチル	75	0	0	0	0.02				75	ピリダフェンチオン	75	0	0	0	0.02				75	ペノキサコール
クロルタルジメチル	75	0	0	0	0.02				75	ピリダベン	75	0	0	0	0.02				75	ペンコナゾール
クロルデン	75	0	0	0	0.02				75	ピリプロキシフェン	75	0	0	0	0.02				75	ペンフルラリン
クロルフェナピル	75	0	0	0	0.02				75	ピンクロゾリン	75	0	0	0	0.02				75	ホサロン
ジクロホップメチル	75	0	0	0	0.02				75	フェナリモル	75	0	0	0	0.02				75	ホスチアゼート
ジクロラン	75	0	0	0	0.02				75	フェノチオカルブ	75	0	0	0	0.02				75	メタクリホス
ジフェナミド	75	0	0	0	0.02				75	フェノトリン	75	0	0	0	0.02				75	メトキシクロル
ジフェノコナゾール	75	0	0	0	0.02				75	フェンチオン	75	0	0	0	0.02				75	メトミノストロピン
ジメチナミド	75	0	0	0	0.02				75	フェンプロコナゾール	75	0	0	0	0.02				75	メトラクロール
ジメピレレート	75	0	0	0	0.02				75	ブタミホス	75	0	0	0	0.02				75	

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 34 点, その他の魚介類由来たん白質 4 点, チキンミール 24 点及びフェザーミール 11 点について, 顕微鏡鑑定, ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果, 牛由来たん白質の混入は認められなかった. なお, PCR 試験において魚粉 2 点から反すう動物由来 DNA が検出されたが, ELISA 試験において同一試料から牛由来たん白質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断した. 肉骨粉 (ポークミール) 3 点, 蒸製骨粉 1 点及び原料混合肉骨粉 21 点について, ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果, 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 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			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
魚粉	34	0	0	34	0	0	34	2	6	0
イカ乾燥物	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
イカ内臓溶解液	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ホタテ抽出物	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
ホタテ内臓粉末飼料	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
計	38	0	0	38	0	0	38	2	5	0

表 8 動物由来たん白質のモニタリングの結果 (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			
	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	試験 点数	検出 点数	検出率 (%)	
チキンミール	24	0	0	24	0	0	24	0	0	0
フェザーミール	11	0	0	11	0	0	11	0	0	0
原料混合肉骨粉				21	0	0	21	0	0	0
蒸製骨粉				1	0	0	1	0	0	0
肉骨粉 (ポークミール)				3	0	0	3	0	0	0
計	35	0	0	60	0	0	60	0	0	0

国内で製造された配混合飼料 37 点, 糖蜜吸着飼料 1 点, 粳米 1 点並びに輸入された牛用混合飼料 11 点について, 顕微鏡鑑定, ELISA 試験及び PCR 試験を実施した結果, 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 及び表 10 に示した.

なお、前年度及び前々年度ともにサルモネラは検出されていない。配混合飼料ではサルモネラは検出されなかった。なお、前年度及び前々年度ともにサルモネラは検出されていない。これらの結果を表 12 及び表 13 に示した。

検出されたサルモネラの血清型は表 14 に示すとおりである。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¹¹⁾によると、飼料から分離されたこの血清型のうち、*S. Montevideo* 及び *S. Alachua* は国内で発生したサルモネラ食中毒の原因菌として過去にヒトからも分離されているが、ここ数年の上位 10 血清型には含まれていなかった。また、残りの血清型についてもここ数年の上位 10 血清型には含まれていなかった。

表 12 サルモネラのモニタリングの結果（単体飼料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試験点数	検出点数	検出率 (%)
動物質性飼料			
チキンミール	16	1	6
フェザーミール	1	0	0
ホタテ内臓粉末飼料	1	0	0
魚粉	27	1	4
原料混合肉骨粉	14	0	0
豚肉骨粉	1	0	0
そうこう類			
米ぬか油かす	1	0	0
植物性油かす類			
なたね油かす	1	0	0
計	62	2	3

表 13 サルモネラのモニタリングの結果（配混合飼料の種類別）

モニタリング等の対象試料	試験点数	検出点数	検出率 (%)
牛用配合飼料	10	0	0
鶏用配合飼料	8	0	0
豚用配合飼料	3	0	0
その他の混合飼料	10	0	0
計	31	0	0

表 14 検出試料から分離されたサルモネラの血清型

検出された飼料の種類	血清型		
	<i>S. Montevideo</i>	<i>S. Othmarschen</i>	<i>S. Alachua</i>
魚粉	1		
チキンミール		1	1
計	1	1	1

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) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-table/1525-iasrb.html>, cited 28 Jul. 2023.

調査資料

2 特定添加物検定結果等について（令和 4 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 2022)

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．

令和 4 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、令和 4 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、令和 4 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

令和 4 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 4 業者（前年度 3 業者）からあり、令和 3 年度申請のなかった 1 業者が製造を再開したため、1 業者増加した．申請のあった 4 業者のそれぞれの製造形態等は、①製剤の製造のみを行っているのが 2 業者、②製剤の輸入のみを行っているのが 2 業者であった．なお、国内製造の製剤に用いられている製造用原体は輸入品であった．

令和 4 年度に検定に合格した特定添加物は 6 種類、9 銘柄（前年度 5 種類、7 銘柄）であった．

また、輸入先国について、製剤の輸入先国は、アピラマイシンが英国、ナラシンが米国、フラボフォスフォリポール、サリノマイシンナトリウム及びモネンシンナトリウムがブルガリア、製造用原体の輸入先国は、サリノマイシンナトリウム及びエンラマイシンが中国で、4 カ国（前年度 4 カ国）であった．

表1 検定申請業者及び品名等一覧
(令和4年度)

管区 ^{※1}	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)
本部	エランコジャパン株式会社 ^{※2}	-	アビラマイシン	○	サーマックス200	200
			ナラシン	○	モンテバン100	100
	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	○	サリノマイシン 10%製剤 K-J	100
	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
神戸	Huvepharma Japan株式会社 ^{※2}	-	サリノマイシンナトリウム	○	サリノ10%R-K	100
			サリノマイシンナトリウム	○	サコックス100	100
			サリノマイシンナトリウム	○	サコックス200	200
			モネンシンナトリウム		モノテック200	200
			フラボフォスフォリポール	○	フラボマイシン80	80
計	4業者	2事業場	6種類		9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

※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

令和4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令和2年度及び令和3年度の結果とともに表2に示した。

令和4年度の検定合格件数は97件，合格数量は631トンで実量力価換算量は83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142.6%，116.5%，117.7%となり，件数，数量及び実量力価換算量ともに増加した。これは前述したとおり，令和3年度製造がなかった業者が製造を再開したことが要因の一つと考えられる。

令和4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48.3%（前年度58.2%）で最も多く，次いでナラシン33.0%（前年度26.3%），アビラマイシン9.5%（前年度11.5%），フラボフォスフォリポール7.3%（前年度3.3%），モネンシンナトリウム1.3%（前年度0%），エンラマイシン0.7%（前年度0.7%）となった。また，実量力価換算量については，令和4年度はサリノマイシンナトリウムが全体の53.8%（前年度59.8%）で最も多く，次いでナラシン25.0%（前年度20.1%），アビラマイシン14.4%（前年度17.7%），フラボフォスフォリポール4.4%（前年度2.0%），モネンシンナトリウム1.9%（前年度0%），エンラマイシン0.4%（前年度実績0.4%）となった。

検定合格数量を類別にみると，令和4年度は，ポリエーテル系が82.6%（前年度84.4%），オルトソマイシン系が9.5%（前年度11.5%），ホスホグリコリピッド系が7.3%（前年度3.3%），ポリペプチド系が0.7%（前年度0.7%）であった。

令和4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，アビラマイシンは減少したが，エンラマイシン，フラボフォスフォリポール，ナラシン及びモネンシンナトリウムは増加した。なお，サリノマイシンナトリウムにおいては表示力価200mg(力価)/gの製剤割合が増えたことにより検定合格数量は減少したが実量力価換算量は増加した。

同様に類別に前年度と比較すると，検定合格数量及び実量力価換算量ともにオルトソマイシン系は減少したものの，ポリペプチド系，ホスホグリコリピッド系及びポリエーテル系は増加した。

亜鉛バシトラシンは平成28年度から，ノシヘプタイドは令和元年度から，ラサロシドナトリウムは平成22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，ビコザマイシンは平成11年度から検定の申請がなく，これらは令和4年度も申請がなかった。なお，ノシヘプタイド及びラサロシドナトリウムは，後述の表4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）
（令和2年度～令和4年度）

種類	特定添加物の種類	令和2年度				令和3年度				令和4年度			
		合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価換算量 (kg(力価))	構成比 (%)	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価換算量 (kg(力価))	構成比 (%)	合格件数 (件)	合格数量 (kg)	実量力価換算量 (kg(力価))	構成比 (%)
ポリパプチド系	亜鉛バシトリン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	エンラマイシン	2	2,780	222	0.2	3	3,720	298	0.4	2	4,120	330	0.4
	ノシヘブタイド	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ホスホグリコリピッド系	小	2	2,780	222	0.2	3	3,720	298	0.4	2	4,120	330	0.4
	フラボフオスフォルポール	5	41,900	3,352	3.5	2	18,000	1,440	2.0	8	46,000	3,680	4.4
	小計	5	41,900	3,352	3.5	2	18,000	1,440	2.0	8	46,000	3,680	4.4
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	79	454,195	49,017	51.8	33	315,220	42,322	59.8	48	304,685	44,841	53.8
	センデユラマイシンナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ナラシン	29	266,050	26,605	28.1	13	142,300	14,230	20.1	20	208,625	20,863	25.0
	モネンシンナトリウム	2	18,000	3,600	3.8	—	—	—	—	2	8,000	1,600	1.9
	ラサロシドナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	小計	110	738,245	79,222	83.7	46	457,520	56,552	79.9	70	521,310	67,304	80.8
オルトソマイシン系	アピラマイシン	16	59,425	11,885	12.6	17	62,550	12,510	17.7	17	59,950	11,990	14.4
	小	16	59,425	11,885	12.6	17	62,550	12,510	17.7	17	59,950	11,990	14.4
	小計	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
その他	小	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0
	小計	133	842,350	94,681	100.0	68	541,790	70,800	100.0	97	631,380	83,303	100.0
総対前年度比 (%)	109.0	135.2	127.0	—	51.1	64.3	74.8	—	142.6	116.5	117.7	—	

—：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。

令和4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97.9%（前年度100%）、検定合格数量全体の98.7%（前年度100%）、実量力価換算量全体の98.1%（前年度100%）を占めた。

ノシヘプタイド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、令和4年度は、ノシヘプタイドは精製級と飼料級のどちらも検定の実績がなく、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）
（令和4年度）

類 別	特 定 添 加 物 の 種 類	精 製 級 ^{**}			飼 料 級 ^{**}		
		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	亜鉛バシトラシン	/	/	/	—	—	—
	エンラマイシン	/	/	/	2	4,120	330
	ノシヘプタイド	—	—	—	—	—	—
ホスホグリコリビッド系	フラボフォスフォリボール	/	/	/	8	46,000	3,680
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	—	—	—	48	304,685	44,841
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	/	/	/
	ナラシン	/	/	/	20	208,625	20,863
	モネンシンナトリウム	2	8,000	1,600	/	/	/
	ラサロシドナトリウム	—	—	—	/	/	/
オルトソマイシン系	アピラマイシン	/	/	/	17	59,950	11,990
その他	ビコザマイシン	—	—	—	/	/	/
合 計		2	8,000	1,600	95	623,380	81,703
割 合 (%)		2.1	1.3	1.9	97.9	98.7	98.1

—：実績なし

※ 斜線は、当該区分の規格がないことを示す。

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

令和4年度初めの時点で、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及びラサロシドナトリウム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。

令和4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、ノシヘプタイド及び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。

令和4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793トン（対前年度比93.6%）、実量力価換算量は119トン(力価)（対前年度比96.3%）であった。

令和4年度の製造数量は、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、ノシヘプタイド、エンラマイシンの順に多かった。また、実量力価換算量は、モネン

シンナトリウム，ラサロシドナトリウム，サリノマイシンナトリウム，エンラマイシン，ノシヘプタイトの順に多かった。

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
(令和3・4年度)

類別	特定添加物の種類	令和3年度		令和4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	83,560	6,685	64,340	5,147
	ノシヘプタイト	84,720	3,389	70,800	2,832
	小計	168,280	10,074	135,140	7,979
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	153,580	15,358	140,840	14,084
	モネンシンナトリウム	379,760	75,952	380,560	76,112
	ラサロシドナトリウム	145,860	21,879	136,780	20,517
	小計	679,200	113,189	658,180	110,713
総計		847,480	123,263	793,320	118,692
対前年度比 (%)		104.3	102.6	93.6	96.3

※ 登録特定飼料等製造業者より聞き取り

5 特定添加物の総数量等

令和4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。

令和4年度に製造及び輸入された特定添加物は8種類あり、総数量を種類別にみると、サリノマイシンナトリウム（31.3%）、モネンシンナトリウム（27.3%）、ナラシン（14.6%）の順に多く、類別ではポリエーテル系が最も多く、1,179トン（検定：521トン、登録：658トン）と全体の82.8%を占めた。また、実量力価換算量を種類別にみると、モネンシンナトリウム（38.5%）、サリノマイシンナトリウム（29.2%）、ナラシン（10.3%）の順に多く、類別でもポリエーテル系が最も多く、178トン(力価)（検定：67トン(力価)、登録：111トン(力価)）と全体の88.1%を占めた。

次に、平成25年度から令和4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1及び図2に示した。

総数量は増減があるものの、減少傾向で推移した。また、その実量力価換算量はおおよそ変わらず推移した。

検定合格数量については増減があるものの、減少傾向で推移した。また、実量力価換算量も同様に減少傾向で推移した。

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、その製造数量は年々増加し、平成29年度から令和元年度までの3年間及び令和3年度以降、検定合格数量を上回っている。令和4年度は、特定添加物の総数量全体の55.7%（前年度61.0%）、実量力価換算量全体の58.8%（前年度63.5%）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
（令和4年度）

類別	特定添加物の種類	総数量 ^{※1}		実量力価換算量 ^{※2}	
		(kg)	構成比 (%)	(kg(力価))	構成比 (%)
ポリペプチド系	亜鉛バシトラシン	—	—	—	—
	エンラマイシン	68,460	4.8	5,477	2.7
	ノシヘブタイド	70,800	5.0	2,832	1.4
	小計	139,260	9.8	8,309	4.1
ホスホグリコリピッド系	フラボフォスフォリボール	46,000	3.2	3,680	1.8
	小計	46,000	3.2	3,680	1.8
ポリエーテル系	サリノマイシンナトリウム	445,525	31.3	58,925	29.2
	センデュラマイシンナトリウム	—	—	—	—
	ナラシン	208,625	14.6	20,863	10.3
	モネンシンナトリウム	388,560	27.3	77,712	38.5
	ラサロシドナトリウム	136,780	9.6	20,517	10.2
	小計	1,179,490	82.8	178,017	88.1
オルトソマイシン系	アビラマイシン	59,950	4.2	11,990	5.9
	小計	59,950	4.2	11,990	5.9
その他	ピコザマイシン	—	—	—	—
	小計	0	0.0	0	0.0
総計		1,424,700	100.0	201,995	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

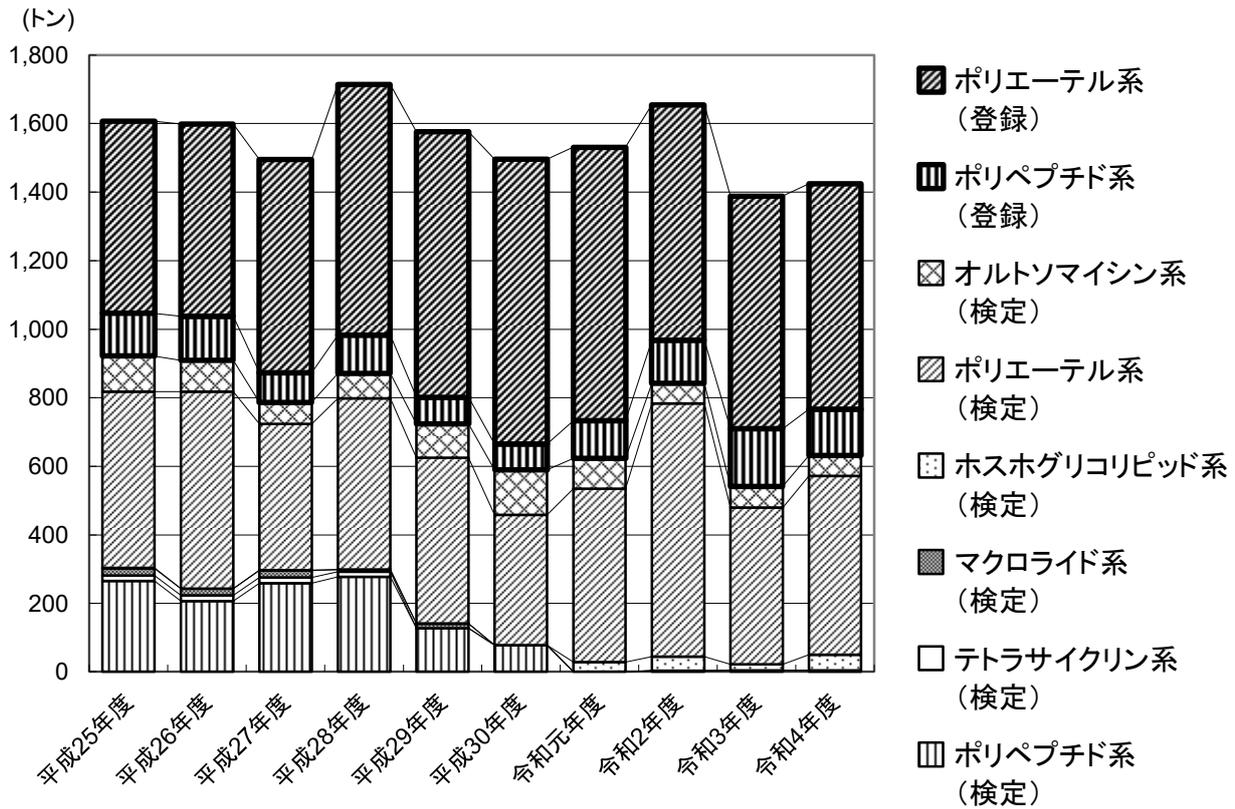


図1 特定添加物の総数量の推移 (類別)

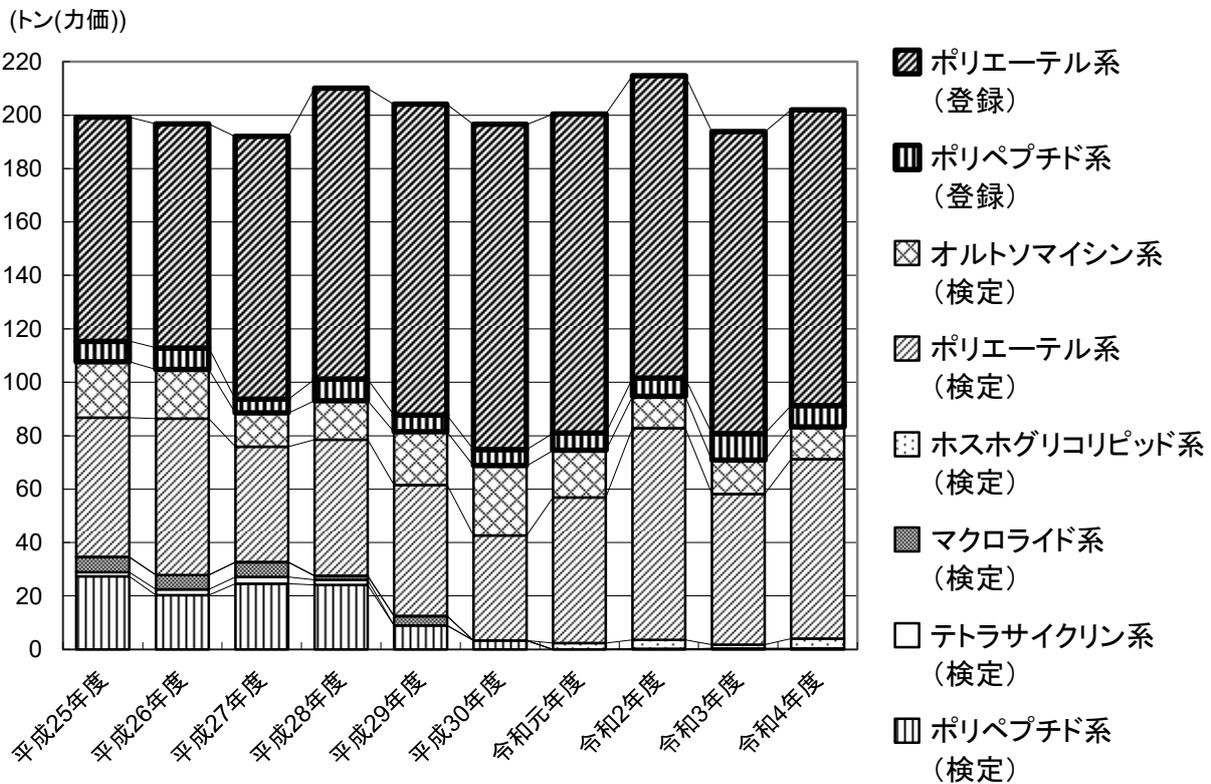


図2 特定添加物の総数の実量カ価換算量の推移 (類別)

7 要 約

- 1) 令和4年度の特定添加物の検定の結果は、以下のとおりである。
 - i 検定に合格した特定添加物は、4業者から申請された、6種類、9銘柄であった。
 - ii 検定合格件数は97件、合格数量は631トン、実量力価換算量は83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。
 - iii 検定合格数量の精製級と飼料級の割合を比較すると、飼料級が全体98.7%を占めた。また、実量力価換算量では、飼料級が98.1%を占めた。
 - iv 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、ナラシン、アビラマイシンの順に多かった。また、実量力価換算量も同様の結果であった。
 - v 検定合格数量を類別にみると、オルトソマイシン系は前年度に比べて減少したが、ポリペプチド系、ホスホグリコリピッド系及びポリエーテル系は増加した。また、実量力価換算量も同様の結果であった。
- 2) 令和4年度の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。
 - i 登録特定飼料等製造業者に登録されているのは1業者1工場であり、5種類製造し、製造数量は793トン、実量力価換算量は119トン(力価)で、前年度に比べて、製造数量及び実量力価換算量ともに減少した。
 - ii 種類別にみると、製造数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、ラサロシドナトリウム、サリノマイシンナトリウムの順に多かった。
- 3) 令和4年度の特定添加物の総数量等の結果は、以下のとおりである。

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、ナラシンの順に多かった。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、ナラシンの順に多かった。

他誌掲載論文

(抄録)

- 1 Extraction efficiency of kojic acid from ammonia-treated or non-treated agar medium with various methanol aqueous solvents

HAYASHI Natsuki, AOYAMA Koji,
KISHIMOTO Marin, MORIMITSU Yasujiro,
FURUKAWA Tomohiro and KUSHIRO Masayo
JSM Mycotoxins, 72(2), 85-87 (2022).

- 2 Whole agar dish culture extraction method to assess the survival of aflatoxigenic fungi in soil samples

KISHIMOTO Marin, FURUKAWA Tomohiro,
HAYASHI Natsuki, KARASAWA Toshihiko,
MORIMITSU Yasujiro, YABE Kimiko and
KUSHIRO Masayo
JSM Mycotoxins, 73(1), 1-5 (2023).

- 3 Inter-laboratory study on simultaneous quantification of ten trichothecenes in feed

NOMURA Masayo, SHIDARA Kenji and
YASUDA Iyo
Mycotoxin Research, 39 (2), 95-108 (2023).
(抄録の掲載なし)

飼料研究報告編集委員

委員長	功刀 豊	副委員長	嶋崎 洋子
	青山 幸二		野崎 友春
	石橋 隆幸		橋本 仁康
	大島 慎司		原 秀樹
	小塚 健志		山多 利秋
	鈴木 知華		吉永 晋
	永原 貴子		綿原 正志

飼料研究報告 第48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/>

令和5年9月

編集 飼料研究報告編集委員会