

○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）一部改正 新旧対照表

（下線部は改正箇所）

改正後	改正前
<p>第 1 章~第 6 章 （略）</p>	<p>第 1 章~第 6 章 （略）</p>
<p>第 7 章 添加物</p>	<p>第 7 章 添加物</p>
<p>1~3 （略）</p>	<p>1~3 （略）</p>
<p>4 亜硝酸ナトリウム</p>	<p>4 亜硝酸ナトリウム</p>
<p>4.1 <u>液体クロマトグラフによる単成分分析法</u></p>	<p>（新設）</p>
<p><u>（適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類及び粉ミルク）</u></p>	
<p><b>A 試薬の調製</b></p>	
<p>1) <u>酢酸アンモニウム緩衝液 酢酸アンモニウム 80 g を水に溶かして 1 L とし、アンモニア水（1+4）で pH を 9.0 に調整する。使用に際してこの液の一定量を水で 10 倍に希釈する。</u></p>	
<p>2) <u>リン酸緩衝液 リン酸水素二ナトリウム十二水和物 1.79 g、リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.78 g 及び過塩素酸ナトリウム一水和物 14.04 g を水に溶かして 1 L とする。</u></p>	
<p>3) <u>亜硝酸ナトリウム標準液 亜硝酸ナトリウム [NaNO<sub>2</sub>]（105 °C で 4 時間乾燥したもの）500 mg を正確に量って 500 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて亜硝酸ナトリウム標準原液を調製する（この液 1 mL は、亜硝酸ナトリウムとして 1 mg を含有する。）。</u></p>	
<p><u>使用に際して、標準原液の一定量をリン酸緩衝液で正確に希釈し、1 mL 中に亜硝酸ナトリウムとして 0.1~10 µg を含有する</u></p>	

改正後	改正前
<p>数点の亜硝酸ナトリウム標準液を調製する。</p> <p>4) <u>硫酸亜鉛溶液</u> <u>硫酸亜鉛七水和物 178 g</u> を水に溶かして 1 L とする。</p> <p style="text-align: center;"><b>B 定 量</b></p> <p><u>抽出</u> <u>分析試料 5 g</u> を正確に量って 200 mL の首太全量フラスコに入れ、<u>酢酸アンモニウム緩衝液 150 mL</u> を加え、密栓して振り混ぜた後、<u>80 °C で 10 分間静置する<sup>注1</sup></u>。続いて<u>硫酸亜鉛溶液 (10 w/v%) 20 mL</u> を加え、密栓して振り混ぜた後、<u>80 °C で 5 分間静置する</u>。更に氷中で 5 分間静置した後、<u>水酸化ナトリウム溶液 (30 w/v%) 2 mL</u> を加え、<u>10 分間静置する<sup>注1</sup></u>。首太全量フラスコの標線までリン酸緩衝液を加え、ろ紙 (5 種 C) でろ過し、初めのろ液約 20 mL を捨て、その後のろ液を試料溶液とする。</p> <p><u>カラム処理</u> <u>グラファイトカーボンミニカラム (500 mg)<sup>注2</sup></u> を水 5 mL で洗浄する。<u>試料溶液をミニカラムに入れ、自然流下させ、初めの流出液 3 mL を捨てる。10 mL の試験管をカラムの下に置き、その後の流出液 2 mL を受ける。この液をメンブランフィルター (孔径 0.45 μm) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。</u></p> <p><u>液体クロマトグラフィー</u> <u>試料溶液及び各亜硝酸ナトリウム標準液各 20 μL</u> を液体クロマトグラフに注入し、<u>クロマトグラムを得る。</u></p> <p><u>測定条件 例<sup>注3</sup></u></p> <p><u>検出器</u> : <u>紫外吸光光度検出器 (測定波長 210 nm)</u></p> <p><u>カラム</u> : <u>アミノ基修飾ビニルアルコールポリマーカラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5</u></p>	

改正後	改正前
<p style="text-align: center;"><u>μm)</u> <sup>注4</sup></p> <p><u>溶 離 液：リン酸緩衝液</u></p> <p><u>流 速：0.8 mL/min</u></p> <p><u>カラム槽温度：40 °C</u></p> <p><u>計 算 得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを</u> <u>求めて検量線を作成し、試料中の亜硝酸ナトリウム量を算出</u> <u>する。</u></p> <p><u>注 1 恒温槽等を使用し、温度が一定に保たれるようにする。</u></p> <p><u>2 ENVI-Carb (500 mg) (Sigma-Aldrich 製) 又はこれと同</u> <u>等のもの</u></p> <p><u>3 本測定条件により得られる試料溶液のクロマトグラムに</u> <u>は約 40 分まで試薬由来のピークが認められるため、連続測</u> <u>定の場合、試料溶液を注入した後、次の測定溶液注入まで</u> <u>の時間を 45 分程度に設定する必要がある。</u></p> <p><u>4 Asahipak NH2P-50 4E (昭和電工製、本測定条件による亜</u> <u>硝酸ナトリウムの保持時間は約 8 分) 又はこれと同等のも</u> <u>の</u></p> <p><u>(参考) 分析法バリデーション</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><u>・添加回収率及び繰返し精度 別表 3 の 29 のとおり</u></li> <li><u>・共同試験 別表 3 の 29 のとおり</u></li> <li><u>・定量限界 (下限) ウェット製品以外の試料：試料中 20</u> <u>mg/kg (平均回収率及び繰返し精度並びに SN 比)、ウェット製</u> <u>品：試料 (原物) 中 各 5 mg/kg (平均回収率及び繰返し精度並</u> <u>びに SN 比)</u></li> <li><u>・検出限界 ウェット製品以外の試料：試料中 6 mg/kg (SN</u> <u>比)、ウェット製品：試料 (原物) 中 各 2 mg/kg (SN 比)</u></li> </ul>	

改正後	改正前
<p>4.2 吸光光度法による単成分分析法  (適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー<sup>注1</sup>、素材乾燥ジャーキー<sup>注1</sup>（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類）</p> <p style="text-align: center;">A 試薬の調製</p> <p>1) 酢酸アンモニウム緩衝液 <u>4.1のAの1)による。</u></p> <p>2) (略)</p> <p>3) 硫酸亜鉛溶液 <u>4.1のAの4)による。</u></p> <p>4)~6) (略)</p> <p style="text-align: center;">B・C (略)</p> <p>(参考) 分析法バリデーション (略)</p> <p>5・6 (略)</p> <p style="text-align: center;">第8章~第11章 (略)</p> <p>別表1 (略)  別表2 (略)  別表3</p> <p style="text-align: center;">分析法バリデーション結果</p>	<p>適用範囲：ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー<sup>注1</sup>、素材乾燥ジャーキー<sup>注1</sup>（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類</p> <p style="text-align: center;">A 試薬の調製</p> <p>1) 酢酸アンモニウム緩衝液 <u>酢酸アンモニウム 80 g を水に溶かして 1 L とし、アンモニア水 (1+4) で pH を 9.0 に調整する。使用に際してこの液の一定量を水で 10 倍に希釈する。</u></p> <p>2) (略)</p> <p>3) 硫酸亜鉛溶液 <u>硫酸亜鉛七水和物 178 g を水に溶かして 1 L とする。</u></p> <p>4)~6) (略)</p> <p style="text-align: center;">B・C (略)</p> <p>(参考) 分析法バリデーション (略)</p> <p>5・6 (略)</p> <p style="text-align: center;">第8章~第11章 (略)</p> <p>別表1 (略)  別表2 (略)  別表3</p> <p style="text-align: center;">分析法バリデーション結果</p>

改正後	改正前																																																																																									
1~14 (略)	1~14 (略)																																																																																									
15 亜硝酸ナトリウム (第7章 4.2) (以下略)	15 亜硝酸ナトリウム (第7章 4) (以下略)																																																																																									
16~28 (略)	16~28 (略)																																																																																									
29 亜硝酸ナトリウム (第7章 4.1) ・添加回収率及び繰返し精度	(新設)																																																																																									
<table border="1"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">試料の種類</th> <th style="text-align: center;">添加濃度 (mg/kg)</th> <th style="text-align: center;">繰返し</th> <th style="text-align: center;">添加回収率 (%)</th> <th style="text-align: center;">繰返し精度 RSD<sub>r</sub> (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">ドライ製品 (猫用)</td> <td style="text-align: center;">20</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">93.0</td> <td style="text-align: center;">7.0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">101</td> <td style="text-align: center;">1.6</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">セミドライ製品 (犬用)</td> <td style="text-align: center;">20</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">108</td> <td style="text-align: center;">1.2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">200</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">0.7</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">ウェット製品 (猫用)</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">108</td> <td style="text-align: center;">2.7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">30</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">92.4</td> <td style="text-align: center;">1.3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">94.7</td> <td style="text-align: center;">1.3</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">成型ジャーキー (犬用)</td> <td style="text-align: center;">20</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">107</td> <td style="text-align: center;">1.4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">103</td> <td style="text-align: center;">1.6</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用)</td> <td style="text-align: center;">20</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">102</td> <td style="text-align: center;">1.7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">97.3</td> <td style="text-align: center;">0.7</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (猫用)</td> <td style="text-align: center;">20</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">102</td> <td style="text-align: center;">1.1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">200</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">93.2</td> <td style="text-align: center;">0.8</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">菓子類 (犬用ビスケット)</td> <td style="text-align: center;">20</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">105</td> <td style="text-align: center;">0.2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">101</td> <td style="text-align: center;">0.7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">200</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">102</td> <td style="text-align: center;">0.4</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">粉ミルク (犬用)</td> <td style="text-align: center;">20</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">108</td> <td style="text-align: center;">1.4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">103</td> <td style="text-align: center;">2.8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">200</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">101</td> <td style="text-align: center;">0.7</td> </tr> </tbody> </table>	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	ドライ製品 (猫用)	20	5	93.0	7.0	100	5	101	1.6	セミドライ製品 (犬用)	20	5	108	1.2	200	5	100	0.7	ウェット製品 (猫用)	5	5	108	2.7	30	5	92.4	1.3	100	5	94.7	1.3	成型ジャーキー (犬用)	20	5	107	1.4	100	5	103	1.6	素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用)	20	5	102	1.7	100	5	97.3	0.7	素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (猫用)	20	5	102	1.1	200	5	93.2	0.8	菓子類 (犬用ビスケット)	20	5	105	0.2	100	5	101	0.7	200	5	102	0.4	粉ミルク (犬用)	20	5	108	1.4	100	5	103	2.8	200	5	101	0.7	
試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)																																																																																						
ドライ製品 (猫用)	20	5	93.0	7.0																																																																																						
	100	5	101	1.6																																																																																						
セミドライ製品 (犬用)	20	5	108	1.2																																																																																						
	200	5	100	0.7																																																																																						
ウェット製品 (猫用)	5	5	108	2.7																																																																																						
	30	5	92.4	1.3																																																																																						
	100	5	94.7	1.3																																																																																						
成型ジャーキー (犬用)	20	5	107	1.4																																																																																						
	100	5	103	1.6																																																																																						
素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用)	20	5	102	1.7																																																																																						
	100	5	97.3	0.7																																																																																						
素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (猫用)	20	5	102	1.1																																																																																						
	200	5	93.2	0.8																																																																																						
菓子類 (犬用ビスケット)	20	5	105	0.2																																																																																						
	100	5	101	0.7																																																																																						
	200	5	102	0.4																																																																																						
粉ミルク (犬用)	20	5	108	1.4																																																																																						
	100	5	103	2.8																																																																																						
	200	5	101	0.7																																																																																						

## 改正後

## 改正前

## ・共同試験

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
ドライ製品 (猫用)	10	1	160	95.2	1.4	5.3	0.70
セミドライ製品 (犬用)	11	0	80	102	2.2	7.6	0.93
ウェット製品 (犬用)	11	0	30	97.1	4.4	7.2	0.76
成型ジャーキー (犬用)	11	0	120	100	1.5	2.6	0.34
菓子類 (犬用バスケット)	10	1	50	101	1.8	5.3	0.60
粉ミルク (犬用)	9	2	20	99.5	4.6	7.1	0.70

## ・クロマトグラム例 (カラム Asahipak NH2P-50 4E、昭和電工製)

標準液 6 µg/mL

添加試料 (素材乾燥ジャーキー  
(ソフトタイプ) (猫用) 200  
mg/kg 相当量添加)

