

V 飼料分析



飼料分析室



機器室

1 通 則

1.1 原子量 原子量は、最新の国際原子量表による。

＊ 国際純粋及び応用化学連合（IUPAC）原子量委員会が発表している（P44別添1参照）。

なお、分子量は原則として構成原子の原子量の和を求めた後、日本工業規格JIS Z 8401数値の丸め方（P46別添2参照）によって小数以下第2位に丸める。

1.2 単 位 主な計量の単位については、日本工業規格（以下、「JIS」と言う。）、日本薬局方（以下「日局」という。）に準じ次の記号を用いる。

メートル	m	センチメートル	cm
ミリメートル	mm	マイクロメートル	μm
ナノメートル	nm	キログラム	kg
グラム	g	ミリグラム	mg
マイクログラム	μg	ナノグラム	ng
平方メートル	m ²	平方センチメートル	cm ²
立方メートル	m ³	リットル	L
ミリリットル	mL	マイクロリットル	μL
水銀柱ミリメートル	mmHg	時	h
分	min		

1.3 百分率、百万分率及び十億分率 重量百分率は％、重量対容量百分率はw／v％、容量百分率はv／v％、容量対重量百分率はv／w％の記号を用いる。また、百万分率はppm、十億分率はppbの記号を用い、重量対重量又は容量対容量の場合に用いる。

1.4 温 度

- （1）温度表示はセルシウス氏法を用い、アラビア数字の次に℃を付けて示す。
- （2）標準温度は20℃、常温は15～25℃、室温は5～35℃とする。
- （3）冷所は、別に規定する場合を除き、1～15℃の場所とする。
- （4）熱水は60℃以上、温水は40～60℃、冷水は15℃以下の水とする。

1.5 試 薬

- （1）試薬は、別に規定する場合を除き、特級、1級とあるものは、工業標準化法（昭和24年法律第185号）に基づくJISの一般試薬の特級若しくは1級の規格に該当するものを、また、日局とあるものは、薬事法（昭和35年法律第145号）に基づく日局の規格に該当するものを示す。
- （2）試薬名の次に〔 〕で分子式を付けたものは、化学的純物質を意味する。
- （3）試薬に（ ）で標準試薬又はひ素分析用と付けたものは、工業標準化法（昭和24年法律第185号）に基づくJISの容量分析用標準試薬 又はひ素分析用試薬の規格に該当するものを、また、標準品と付けたものは、薬事法（昭和35年法律第145号）に基づく日局の標準品の規格に該当するものを示す。
- （4）液体試薬の希釈割合を示す場合、例えば、塩酸（1＋2）とあるのは、塩酸1mL、水2mLの割合で調

製したものとする。

(5) 混合溶媒の混合割合を示す場合、例えば、水－アセトニトリル－メタノール(10＋8＋5)とあるのは、水100mL、アセトニトリル80mL、メタノール50mLの割合で調製したものとする。

1.6 水 単に水とあるのは、その純度が日局の精製水の規定に該当するものとする。

* 一定の品質、純度の規定に適合する水であれば、イオン交換樹脂を用いて精製した水でも、あるいは蒸留によって精製した水でも差し支えない。また、最近では分子膜、逆浸透膜あるいは限外ろ過膜を用いてろ過したものがあり、更にイオン交換樹脂とこれらの組み合わせによって精製したものもある。このほか水については「煮沸冷却した水」、すなわち二酸化炭素を含まない水を用いる場合があるが、これは精製水を約15分間煮沸した後手早く冷却したものである。

高速液体クロマトグラフィーの溶離液として用いる水は、市販の高速液体クロマトグラフ用蒸留水又は蒸留水を Milli Q Labo (日本ミリポア製) 等で作成した超純水を用いる。これらはメンブランフィルターを通してあるため、そのまま溶離液として用いることができる。

普通の蒸留水をそのまま使用もできる(高感度のUV検出器、RI検出器には不可)が、その場合必ず0.45 μ mのメンブランフィルターを通過させて使用する。

1.7 溶液 単に溶液とあり、溶媒を示さないものは、水溶液とする。

1.8 計量器

(1) 計量器は検定を受けたものを用いる。

(2) 化学はかりは、0.1mgの差を読みとれるものを用い、セミマイクロ化学はかりは、0.01mgの差を読みとれるものを用いるものとする。

分銅は、直示化学はかりに用いる場合を除き、1級精密分銅を用いるものとする。更に正確を必要とする場合は、器差試験を受けた分銅を用いるものとする。



化学はかり



セミマイクロ化学はかり

1.9 器具、機器等

(1) 分析用ガラス器具、分析用陶磁器、化学分析用白金るつぼ、ふるい及びろ紙は、別に規定する場合を除き、J I Sに該当するものを用いるものとする。

(2) デシケーター中の乾燥剤は、別に規定する場合を除き、シリカゲルを用いるものとする。

(3) 分析に用いる機器は、別に規定する場合を除き、J I Sに該当するもの又はそれと同等以上のものを用いるものとする。

＊ 乾燥剤には、シリカゲル、過塩素酸マグネシウム、塩化カルシウム（無水）、五酸化りん、濃硫酸、その他があるが、特にことわりのない場合はシリカゲルとする。シリカゲルは取り扱い及び再生が簡易であるため一般的な乾燥剤と考えられるが、吸湿の目安として付けられているコバルト塩の青色が少しでも減退した場合には、130～140℃で2～3時間乾燥する。

なお、デシケーター内を減圧にする場合は、通常15mmHg（2.0kPa）以下とする。

J I S K 8001試薬試験方法通則を参照のこと。

別添1 原子量表(1995)について

日本化学会原子量小委員会

元素の原子量が、質量数12の炭素を12(端数なし)として、これに対する相対値を用いる、というように改められたのは1961年であり、それから既に四半世紀が経過した。この間に質量分析法等の物理的手法による各々の核種の質量及び各元素の同位体存在度の測定データも質、量共に格段に向上した。しかし、いくつかの元素については、未だに20世紀初頭に化学的に求められた原子量に依存しているものもある。IUPACの原子量委員会では隔年に新しく測定されたデータを収集し、検討を加えて、新しい原子量表を公表しており、日本化学会原子量小委員会は、その表をもとに毎年四月に原子量表を作成している。この原子量表を正しく有効に使用できるように以下に簡単に解説する。更に詳しいことはIUPAC原子量委員会の報告書^{*1}及び総説^{*2}を参照していただきたい。

原子量表に記載されている各元素の原子量の値は、表の前文に書かれているように、地球上に存在する元素の示す原子量値である。原子量は、光速などのような自然界における定数ではなく、単核種元素以外の元素では物質の起源や処理の仕方などにより変わり得るものである。これは原子量がそれぞれの元素を構成している同位体の存在度に依存しているからである。測定技術の進歩により、同位体存在度は必ずしも一定ではなく、地球上で起こる、または起こされる様々な過程のために変動し、それが原子量に影響してくるということがわかってきた。これは各元素ごとに与える原子量の値の精度が異なってくることを意味する。原子量表の各原子量の値の後に、() の中に表示した数字は、その原子量の最後の桁の値に対する不確かさである。例えば水素の場合、1.00794(7)と書いてあるのは1.00794±0.00007であることを示す。

最も正確で、精度もよいと考えられている元素は20個の単核種元素である。単核種元素は、ただ一個の安定核種又は半減期が 3×10^{10} 年以上の長寿命核種をもつ元素と定義されており、物理的方法で求めたそれぞれの核種の質量^{*3}に一定の基準で安全度を加味して用いている。

元素の中には、地球上で採取された試料の大部分はある一定の同位体組成を示すが、いくつかの特定の試料では一般のものと異なった同位体組成を示すものがある。この様な元素には注に“g”(geologically…の頭文字)と記し、地球上に普通に存在する試料を採取した場合でも、時によっては原子量表の値をそのまま使うことができないということを示している。上記の場合と異なり、例えば酸素のように、空気、海水、陸水、岩石、酸化鉱物、動物、植物など種々の形で地球上に存在するが、これらの物質間で同位体組成が変動しているため、どれか一つの値に特定することができない元素がある。このような元素では、測定技術が如何に進んでも精度の良い原子量値を与えることができない。それらの元素には注に“r”(range in isotopic…の頭文字)が附してある。また既に人工的に同位体分離をうけた試料が試薬などとして一般にでまわっていることがある。その顕著なものには、水素、リチウム、ホウ素、ウランなどがある。このような元素には注に“m”(modified…の頭文字)と記して注意を喚起している(このような試薬は通常ラベルに明記してあるので注意すること)。

*1. IUPAC inorganic Chemistry Division.CAWIA:Atomic Weights of the Elements 1995.Pure Appl.Chem.68.to be published.

*2. H.S.Peiser et al.:Element by Element Review of Their Atomic Weights.Pure Appl.Chem.58.695 (1984).

*3. G.Audi and A.H.Wapstra:The 1993 Atomic Mass Evaluation (1).Atomic Mass Table.Nucl.Phys.A565.1 (1993).

安定同位体のない元素の同位体表

この表は、原子量表(1995)で*を付した安定同位体のない元素についてまとめたものである。

原子番号	元素名	元素記号	同位体の質量数 ¹	原子番号	元素名	元素記号	同位体の質量数 ¹
43	テクネチウム	Tc	97,98,99	97	バークリウム	Bk	247,249
61	プロメチウム	Pm	145,147	98	カリホルニウム	Cf	249,250,251,252
84	ポロニウム	Po	209,210	99	アインスタイニウム	Es	252
85	アスタチン	At	210,211	100	フェルミウム	Fm	257
86	ラドン	Rn	211,220,222	101	メンデレビウム	Md	256,258
87	フランシウム	Fr	223	102	ノーベリウム	No	259
88	ラジウム	Ra	223,224,226,228	103	ローレンシウム	Lr	262
89	アクチニウム	Ac	227	104	ウンニルクアジウム	Unq	261
90	トリウム	Th	230,232	105	ウンニルベンチウム	Unp	262
91	プロトアクチニウム	Pa	231	106	ウンニルヘキシウム	Unh	263
92	ウラン	U	233,234,235,236,238	107	ウンニルセプチウム	Uns	264
93	ネプツニウム	Np	237,239	108	ウンニルオクチウム	Uno	265
94	プルトニウム	Pu	238,239,240,241,242,244	109	ウンニルエンニウム	Une	268
95	アメリシウム	Am	241,243	110	ウンウンニリウム	Uun	269
96	キュリウム	Cm	243,244,245,246,247,248	111	ウンウンウニウム	Uuu	272

現在および近い将来しばしば見いだされると思われる代表的な同位体を示した。

Ar(¹²C) = 12 (ただし¹²Cは核的基底状態にある中性原子)

多くの元素の原子量値は一定ではなく、物質の起源や処理の仕方に依存する。原子量A_r(E)とその不確かさ(カッコ内の数字、有効数字の最後の桁に対応する)は地球上に天然に存在する元素に適用される。個々の元素に起こりうるもので、原子量に付随して示されている不確かさを越える可能性のある変動の様式は脚注に詳細に示されている。原子番号104から111の元素名は暫定的である。

元 素 名	元素 記号	原子 番号	原 子 量	脚注	元 素 名	元素 記号	原子 番号	原 子 量	脚注
アインスタイニウム*	Es	99			タ ン タ ル	Ta	73	180.9479 (1)	
亜 鉛	Zn	30	65.39 (2)		チ タ ン	Ti	22	47.867 (1)	
ア ク チ ニ ウ ム*	Ac	89			窒 素	N	7	14.00674 (7)	g r
ア ス タ チ ン*	At	85			ツ リ ウ ム	Tm	69	168.93421 (2)	
ア メ リ シ ウ ム*	Am	95			テ ク ネ チ ウ ム*	Tc	43		
ア ル ゴ ン	Ar	18	39.948 (1)	g r	鉄	Fe	26	55.845 (2)	
ア ル ミ ニ ウ ム	Al	13	26.981538 (2)		テ ル ビ ウ ム	Tb	65	158.92534 (2)	
ア ン チ モ ン	Sb	51	121.760 (1)	g	テ ル ル	Te	52	127.60 (3)	g
硫 黄	S	16	32.066 (6)	g r	銅	Cu	29	63.546 (3)	r
イ ッ テ ル ビ ウ ム	Yb	70	173.04 (3)	g	ト リ ウ ム*	Th	90	232.0381 (1)	g
イ ッ ト リ ウ ム	Y	39	88.90585 (2)		ナ ト リ ウ ム	Na	11	22.989770 (2)	
イ リ ジ ウ ム	Ir	77	192.217 (3)		鉛	Pb	82	207.2 (1)	g r
イ ン ジ ウ ム	In	49	114.818 (3)		ニ オ ブ	Nb	41	92.90638 (2)	
ウ ラ ン*	U	92	238.0289 (1)	g m	ニ ッ ケ ル	Ni	28	58.6934 (2)	
ウンウンニウム*	Uuu	111			ネ オ ジ ム	Nd	60	144.24 (3)	g
ウンウンニリウム*	Uun	110			ネ オ ン	Ne	10	20.1797 (6)	g m
ウンニルエンニウム*	Une	109			ネブツニウムノーベ*	Np	93		
ウンニルオクチウム*	Uno	108			リ ウ ム*	No	102		
ウンニルクアジウム*	Unq	104			バ ー ク リ ウ ム*	Bk	97		
ウンニルセブチウム*	Uns	107			白 金	Pt	78	195.078 (2)	
ウンニルヘキシウム*	Unh	106			バ ナ ジ ウ ム	V	23	50.9415 (1)	
ウンニルベンチウム*	Unp	105			ハ フ ニ ウ ム	Hf	72	178.49 (2)	
エ ル ビ ウ ム	Er	68	167.26 (3)	g	パ ラ ジ ウ ム	Pd	46	106.42 (1)	g
塩 素	Cl	17	35.4527 (9)	g m	バ リ ウ ム	Ba	56	137.327 (7)	
オ ス ミ ウ ム	Os	76	190.23 (3)	g	ビ ス マ	Bi	83	208.98038 (2)	
カ ド ミ ウ ム	Cd	48	112.411 (8)	g	ヒ 素	As	33	74.92160 (2)	
ガ ド リ ニ ウ ム	Gd	64	157.25 (3)	g	フ ェ ル ミ ウ ム*	Fm	100		
カ リ ウ ム	K	19	39.0983 (1)		フ ッ ソ 素	F	9	18.9984032 (5)	
ガ リ ウ ム	Ga	31	69.723 (1)		ブ ラ セ オ ジ ム	Pr	59	140.90765 (2)	
カ リ ホ ル ニ ウ ム*	Cf	98			フランシウムプルト*	Fr	87		
カ ル シ ウ ム	Ca	20	40.078 (4)	g	ニ ウ ム*	Pu	94		
キ セ ノ ン	Xe	54	131.29 (2)	g m	プロトアクチニウム*	Pa	91	231.03588 (2)	
キ ュ リ ウ ム*	Cm	96			プ ロ メ チ ウ ム*	Pm	61		
金	Au	79	196.96655 (2)		ヘ リ ウ ム	He	2	4.002602 (2)	g r
銀	Ag	47	107.8682 (2)	g	ベ リ リ ウ ム	Be	4	9.012182 (3)	
ク リ プ ト ン	Kr	36	83.80 (1)	g m	ホ ウ 素	B	5	10.811 (7)	g mr
ク ロ ー ム	Cr	24	51.9961 (6)		ホ ル ミ ウ ム	Ho	67	164.93032 (2)	
ケ イ 素	Si	14	28.0855 (3)	r	ポ ロ ニ ウ ム*	Po	84		
ゲ ル マ ニ ウ ム	Ge	32	72.61 (2)		マ グ ネ シ ウ ム	Mg	12	24.3050 (6)	
コ バ ル ト	Co	27	58.933200 (9)		マン ガ ン	Mn	25	54.938049 (9)	
サ マ リ ウ ム	Sm	62	150.36 (3)	g	メンデレビウム*	Md	101		
酸 素	O	8	15.9994 (3)	g r	モ リ ブ デ ン	Mo	42	95.94 (1)	g
ジ ス プ ロ シ ウ 素	Dy	66	162.50 (3)	g	ユ ウ ロ ピ ウ ム	Eu	63	151.964 (1)	g
臭 素	Br	35	79.904 (1)		ヨ ウ 素	I	53	126.90447 (3)	
ジ ル コ ニ ウ ム	Zr	40	91.224 (2)	g	ラ ジ ウ ム*	Ra	88		
水 銀	Hg	80	200.59 (2)		ラ ン ド ン*	Rn	86		
水	H	1	1.00794 (7)	g mr	ラ ン タ ン	La	57	138.9055 (2)	g
ス カ ン ジ ウ ム	Sc	21	44.955910 (8)		リ チ ウ ム	Li	3	(6.941) ^t	g mr
ス ト ロ ン チ ウ ム	Sn	50	118.710 (7)	g	リ ン	P	15	30.973761 (2)	
セ シ ウ ム	Sr	38	87.62 (1)	g r	ル テ チ ウ ム	Lu	71	174.967 (1)	g
セ リ ウ ム	Cs	55	132.90545 (2)		ル テ ニ ウ ム	Ru	44	101.07 (2)	g
セ レ ン	Ce	58	140.116 (1)	g	ル ビ ジ ウ ム	Rb	37	85.4678 (3)	g
タ リ ウ ム	Se	34	78.96 (3)		レ ニ ウ ム	Re	75	186.207 (1)	
タ ン グ ス テ ン	Tl	81	204.3833 (2)		ロ ジ ウ ム	Rh	45	102.90550 (2)	
炭 素	W	74	183.84 (1)		ロ ー レ ン シ ウ ム*	Lr	103		
	C	6	12.0107 (8)	g r					

*: 安定同位体のない元素。

t: 市販品中のリチウムの原子量は6.94から6.99の幅をもつ。さらに正確な原子量が必要な場合は、個々の物質について測定する必要がある。

g: その元素の同位体組成が正常な物質に対する限界値の外になるような地質学的試料が知られている。そのような試料中の当該元素の原子量と、この表に記した値との差が、表記の不確かさを越えることがある。

m: 不明の、あるいは不注意な同位体分別をうけたために、異なった同位体組成をもつものが市販品中に見出されることがある。そのため当該元素の原子量が表記の値とかなり異なることがあり得る。

r: 正常な地球物質の同位体組成に幅があるため、さらに精度のよい原子量値を示すことができない。Ar(E)値は正常な物質すべてに適用されるものとする。

別添 2 数値の丸め方

(1961改正、1994確認)

1. 適用範囲 この規格は、鉚工業において用いる十進法の数値の丸め方について規定する。
2. 数値の丸め方 ある数値を、有効数字 n ケタ⁽¹⁾ の数値に丸める場合、または少数以下 n ケタの数値に丸める場合には、 $(n+1)$ ケタ目以下の数値を、つぎのように整理する。

注⁽¹⁾ 有効数字のケタ数とは、0 でない最高位の数字の位から数えたものとする。

- (1) $(n+1)$ ケタ目以下の数字が、 n ケタ目の 1 単位の $1/2$ 未満の場合には切り捨てる (例 1 参照)。
- (2) $(n+1)$ ケタ目以下の数値が、 n ケタ目の 1 単位の $1/2$ をこえる場合には、 n ケタ目を 1 単位だけ増す (例 2 参照)。
- (3) $(n+1)$ ケタ目以下の数値が、 n ケタ目の 1 単位の $1/2$ であることがわかっているか、または $(n+1)$ ケタ目以下の数値が切り捨てたものか切り上げたものかがわからない場合には、(a) または (b) のようにする。
 - (a) n ケタの数値が、0,2,4,6,8 ならば、切り捨てる (例 3 参照)。
 - (b) n ケタの数値が、1,3,5,7,9 ならば、 n ケタ目を 1 単位だけ増す (例 4 参照)。
- (4) $(n+1)$ ケタ目以下の数値が、切り捨てたものか切り上げたものであることがわかっている場合には、(1) または (2) の方法によらなければならない (例 5 参照)。

備 考 この丸め方は、1 段階に行わなければならない。

たとえば、5.346 をこの方法で有効数字 2 ケタに丸めれば、5.3 となる。これを 2 段階に分けて

(1 段階目) (2 段階目)

5.346 5.35 5.4

のようにしてはいけない。

例 1 : 1.23 を、有効数字 2 ケタに丸めれば、(1) の方法により 1.2
1.2344 を、有効数字 3 ケタに丸めれば、(1) ♪ 1.23
1.2344 を、小数点以下 3 ケタに丸めれば、(1) ♪ 1.234

2 : 1.26 を、有効数字 2 ケタに丸めれば、(2) の方法により 1.3
1.2501 を、有効数字 2 ケタに丸めれば、(2) ♪ 1.3
1.2967 を、有効数字 3 ケタに丸めれば、(2) ♪ 1.30
1.2967 を、小数点以下 3 ケタに丸めれば、(2) ♪ 1.297

- 3 : 0.105 { この数値は、有効数字 3 ケタ目が正しく 5 であることがわかっているか、またはきり捨てたものか、切り上げたものかがわからないとする。
を、有効数字 2 ケタに丸めれば、(3) (a) の方法により 0.10
- 1.450 { この数値は、有効数字 3 ケタ目以下が正しく有効数字 2 ケタ目の 1 単位の $1/2$ であることがわかっているか、または切り捨てたものか、切り上げたものかがわからないものとする。
を、有効数字 2 ケタに丸めれば、(3) (a) の方法により 1.4
- 1.25 { この数値は、有効数字 3 ケタ目が正しく 5 であることがわかっているか、またはきり捨てたものか、切り上げたものかがわからないとする。
を、有効数字 2 ケタに丸めれば、(3) (a) の方法により 1.2
- 0.0625 { この数値は、小数点以下 4 ケタ目が正しく 5 であることがわかっているか、または切り捨てたものか、切り上げたものかがわからないとする。
を、小数点以下 3 ケタに丸めれば、(3) (a) の方法により 0.062
- 4 : 0.0955 { この数値は、有効数字 3 ケタ目が正しく 5 であることがわかっているか、または切り捨てたものか、切り上げたものかがわからないとする。
を、有効数字 2 ケタに丸めれば、(3) (b) の方法により 0.096
- 1.350 { この数値は、有効数字 3 ケタ目以下が正しく有効数字 2 ケタ目の 1 単位の $1/2$ であることがわかっているか、または切り捨てたものか、切り上げたものかがわからないとする。
を、有効数字 2 ケタに丸めれば、(3) (b) の方法により 1.4
- 1.15 { この数値は、有効数字 3 ケタ目が正しく 5 であることがわかっているか、または切り捨てたものか、切り上げたものかがわからないとする。
を、有効数字 2 ケタに丸めれば、(3) (b) の方法により 1.2
- 0.095 { この数値は、小数点以下 3 ケタ目が正しく 5 であることがわかっているか、または切り捨てたものか、切り上げたものかがわからないとする。
を、小数点以下 2 ケタに丸めれば、(3) (b) の方法により 0.10
- 5 : 2.35 この数値は、たとえば、2.347 を切り上げたものであることがわかっているとする。
を、有効数字 2 ケタに丸めれば、(1) の方法により 2.3
- 2.45 この数値は、たとえば、2.452 を切り捨てたものであることがわかっているとする。
を、有効数字 2 ケタに丸めれば、(2) の方法により 2.5
- 4.185 この数値は、たとえば、4.1852 を切り捨てたものであることがわかっているとする。
を、小数点以下 2 ケタに丸めれば、(2) の方法により 4.19

2 サンプルング

一般的に、サンプルングは、分析結果を知りたい試料の**代表サンプル**となるものを採取することである。

分析業務で、サンプルングは重要な位置付けにあり、サンプルングしたものが対象とする試料の代表サンプルとならなかった場合、せっかく分析結果を得ることができたとしても意味がない。だからと言って、分析点数を増やすことは、分析コスト、労力、時間の浪費である。そこで、出来る限りサンプルングを正確に行うことが重要となる。当然、異物の混入しないように行うことは言うまでもない。

しかしながら、飼料の給与時にサンプルングをする現状等では、なかなか、代表的なサンプルを採取することが困難な状況にあるので、ここでは、一般的な採取方法とその状況に応じた採取方法及び郵送方法について説明する。



異物の混入例1（ラップシート）



異物の混入例2（ひも）



異物の混入例3（ひも）

2.1 梱包された飼料

【主な飼料】

- ① ロールベール、コンパクトベール、ラップサイレージ等
- ② 紙袋、麻袋及びトランスバックに入っている飼料及び飼料原料等



ロールベール



ラップ

【サンプリング対象ロット】

- ① については、圃場、草種品種又は混播割合、刈取り日、収穫日が同じものを同一ロットとする。
- ② については、一般に購入飼料であるので、
 - 1) 飼料添加物に関しては同一製造番号のもの。
 - 2) 単体飼料については、
製造番号が付いている場合については同一製造番号のもの。
製造番号が付いていない場合は、基本的に搬入日が同じものとするが、明らかに、輸出国又は輸入年月が異なると判明した場合は、搬入日が同日であり飼料の種類が同じであっても区別する。



製造番号等が付いている紙袋1（製造年月:平成12年2月 製造番号:CH）



製造番号等が付いている紙袋2（製造年月:1998年12月 製造番号:424）

【サンプリング方法】

同一ロットのものを対象にサンプリングを行う。

①ロールベール、コンパクトベール、ラップサイレージ等の場合

- 1) 一般法 サンプルリング対象から3～5本をランダムに抽出して、解体し、表面から10～15cm程度の部分を取り除き、1本につき3箇所（上、中、下）以上からランダムに一掴み程度（約100～300g）を抜取る。次に、抜取ったものを均一になるまで良く混合し、その中から200～300gを取り、代表サンプルとする。

<例1> ロールベール（又はラップサイレージ）の場合



①ロールベール（又はラップサイレージ）を3本用意する



②ヘイカッターで解体する



③ランダムに3箇所（上中下）から採取する



④1本につき3箇所から採取するので
9箇所からのサンプリングとなる

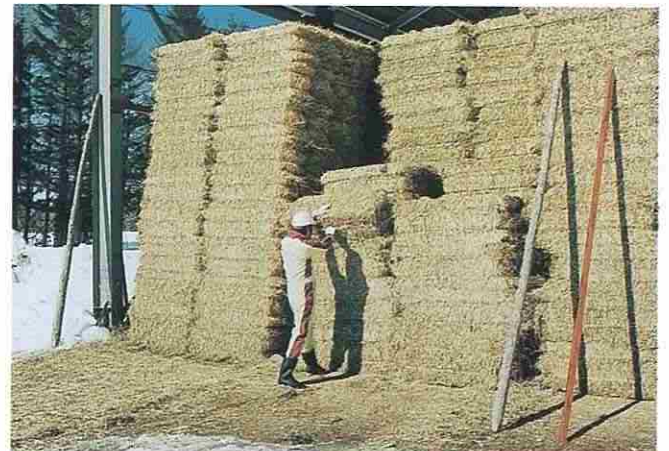


⑤混合したものから200～300g程度とり代表サンプルとする

<例2>コンパクトベールの場合



①保管場所から5個選ぶ



②選ぶときはランダムに行う



③選んだ5個のコンパクトベール



④表面から10～15cm下の部分を1個につき
3箇所から一掴み程度採取する



⑤この5つを合わせ良く混合する



⑥混合したものから200～300g程度とり
代表サンプルとする

2) ヘイサンプラー法 実際には、数本のものを解体して、サンプリングを行うことは、過度に負担に係る場合が多く、この場合は、ヘイサンプラー（写真参照）を用いると作業内容が軽減される。この場合も「一般法」と同様にサンプリング対象から3～5本をランダムに抽出する。次に、1本につき3箇所（上、中、下）以上に印を付け、その部分の包装を解き、ヘイサンプラーで試料を抜き取る。抜き取った試料の表面から10～15cm程度の部分を取り除き、均一になるまで良く混合し、その中から200～300gを取り、代表サンプルとする。



①ラップサイレージ等を3本用意する



②側面からの採取



③上部からの採取（下部についても行う）



④表層部分は捨てる



⑤各3箇所から採取した試料を集めて良く混合する



⑥混合したものから200～300g程度とり
代表サンプルとする

3) 給与時の解体の時にする場合 その時々での給与体系によって解体方法も異なるが、解体時に3箇所（上、中、下）以上から一掴み程度（約100～300g）取り、均一になるまで良く混合し、その中から200～300gを取り、代表サンプルとする。この場合、解体個数が多いほど、その代表サンプルが採取できる可能性が高いが、1本程度でのサンプリングでは、その1本の代表サンプルとは言えるが、同一ロット全体の代表とは、言いづらい。

② 紙袋、麻袋及びトランスバックに入っている飼料及び飼料原料等の場合

同一ロットのものから3～5本をランダムに抽出し、開封後、スコップ等により1袋当たり250g程度採取して、良く混合したものを代表サンプルとする。

バラツキの大きいと考えられるものの場合は、1袋からの採取量を500g以上とし同様に進行。



① サンプリング対象試料の保管庫でロット番号が同一であるか確認する



② ロット番号が確認できたら3～5袋をランダムに取り出す



③ 開封する

④ 1袋当たり250g程度採取する

⑤ この3つを良く混合して 合わせて分析試料とする

2.2 梱包されていない飼料

【主な飼料】

サイロ（タワー、トレンチ、スタック及びバンカー）及びアグパック

これらのものから、代表的な試料を1つだけ採取することは、現実的に不可能であるので、日常業務の給与時に、その日に給与する飼料の代表サンプルを採取する。

サンプリング方法は、解体時に3箇所以上から一掴み程度（約100～300g）取り、均一になるまで良く混合し、その中から200～300gを取り、代表サンプルとする。

＜例1＞タワーサイロの場合



①タワーサイロ



②1回の給与量を流しシートに受ける



③ランダムに5箇所から採取する



④この5つを良く混合する



⑤混合したものから200～300g程度とり
代表サンプルとする

現実にこのようなサンプリングが行えない場合には、取り出し口から少しずつ試料をバケツ等に抜き取り、それを良く混合して、この中から200～300g程度とって、代表サンプルとする。

＜例２＞スタックサイロの場合



①スタックサイロ



②１回給与量を取り出す



③シート等の上に置く



④バケツ等で５箇所から採取する



⑤５箇所から採取したものをシートに並べる



⑥この５箇所から少しづつ採取して、
良く混合したものから200～300g程
度とり、代表サンプルとする

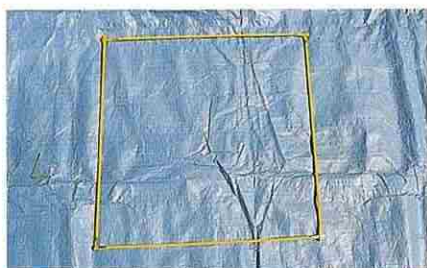
現実にこのようなサンプリングが行えない場合には、表面から10～15cm程度の深さのところから、スコップ等を用いてランダムに５箇所選んで試料をバケツ等に抜き取り、それを良く混合して、この中から200～300g程度とって、代表サンプルとする。

2.3 放牧地等圃場の場合

圃場の場合、同じ様な植生で牧草が生育している場合は、どこから採取しても問題はないが、圃場が均一でない場合には、採取場所を考えねばならない。

サンプリングをしたい圃場を下図のように5ブロックに分けて、各ブロックを観察して、その植生と生育期の代表と成り得ると判断できるところに枠（写真参照）を置き、枠の内側の牧草を刈取る。（枠は1 m×1 m、50cm×50cm、30cm×30cmものを用意しておき、圃場の植生等に適したものを1つ用いる。）

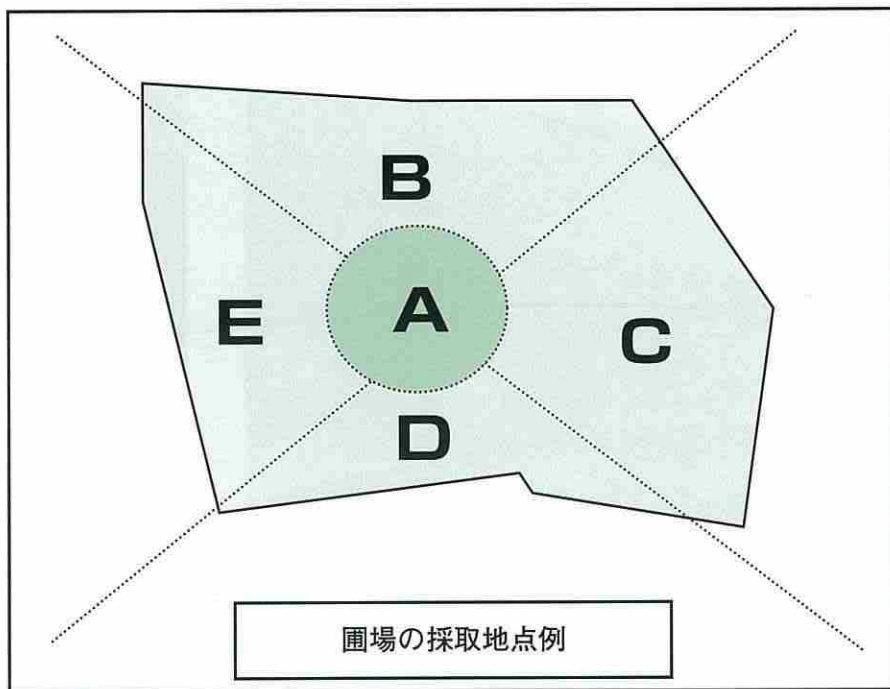
刈取った5箇所の牧草を個々に十分に混合し均一になったら、その中からランダムに一掴み程度（約100～300g）つつを抜き取り、次に、抜き取ったものを均一になるまで良く混合して、その中から200～300gを取り、代表サンプルとする。



① 枠を用意する



② 圃場の植木等を観察する



③ 代表的な場所に枠を置く



④ 枠の内側をすべて刈り取る



⑤ 刈り取ったもの（良く混合する）



⑥ 5 箇所につておこなう



⑦ 各 5 箇所のものから
一掴み分取する



⑧ 良く混合して、この中から
200～300gを代表試料とする

2.4 輸 送

試料の輸送は、基本的に空気を遮断した状態で行う。空気が混入している場合、品質が劣化する恐れがある。

2.4.1 生草（放牧草）及びサイレージ

基本的に予備乾燥した状態で輸送する。

予備乾燥を行わないで送る場合は、要冷蔵で、空気を掃除機等で出来る限り除去し、到着しだい分析に取り掛かれる状態の時のみ行う。しかし、水分含有量が15%を越えている場合は輸送中にカビが発生する恐れがあるので、輸送の際には水分管理をする。

＊ 予備乾燥 恒温乾燥機で、60℃・12時間乾燥し、24時間室温で放置したもの。恒温乾燥機等が無い場合は自然乾燥でも良い。

2.4.2 乾 草

水分含量が15%以下の場合は、そのまま送る。15%以上の場合には、予備乾燥してから送る。

2.4.3 その他

上記、2.4.1及び2.4.2を参考に水分含量を考慮して、行う。



①採取袋（チャック付きのもの）に番号を付け
間違いの起きないようにする



②試料を袋に入れる



③掃除機等で空気を吸い出す



④チャックをして要冷蔵で送付する

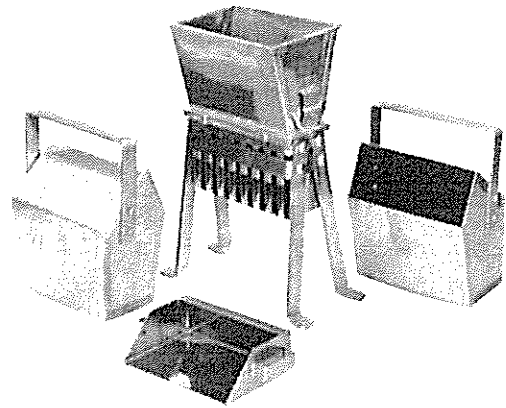
3 分析試料の調製法

分析試料は、別に規定する場合を除き、次により調製し、共栓ガラス瓶等の気密容器に貯蔵しておくものとする。

なお、分析試料の調製に当っては操作を迅速に行い、試料が含有する水分の増減及び試料の化学変化が生じないように留意するものとする。

(1) 試料が乾燥している場合には、試料を粉碎して1 mmの網ふるいを通してよく混合する。

(2) 試料が湿潤な場合には、試料を混合した後、二分器で縮分して200 g以上の必要量をとってその重さを量り、60℃以下(12時間)で乾燥し、更に室内に放置して風乾し(以下「予備乾燥」という。)、再び重さを量った後、(1)の方法により試料を調製し、その分析値を原試料の含量に換算する。



主要部はステンレス製で、内面は平滑に仕上げられており、上部試料皿に付けられた切替羽根により落下した試料は、内部に残らず、完全に受器に落ちるようになっている。

二分器(試料縮分器)

(3) 試料の脂肪含量が多いため粉碎することが困難な場合には、試料を混合した後、二分器で縮分して200 g以上の必要量をとってその重さを量り、乳ばちの中できちんと砕いてビーカーに移し、乳ばちに付着した試料をジエチルエーテルで洗浄して洗液をビーカーに加え、アルミニウム箔でふたをして1日間静置した後、ジエチルエーテルをデカンテーション(上澄みを捨てること)により1,000~2,000 mLのメスフラスコに移す。

ビーカー中の不溶解物にジエチルエーテルを注ぎ、アルミニウム箔でふたをして1日間静置した後、デカンテーションにより先のメスフラスコに移し、不溶解物をあらかじめ重さを量っておいた大型ろ紙(5種A)でろ過し、ジエチルエーテルで洗浄し、洗液を先のメスフラスコに加える。

次に、不溶解物をろ紙とともに風乾した後、60~80℃で乾燥し、更に室内に放置して風乾し、再び重さを量った後、(1)の方法により試料を調製し、その分析値を原試料の含量に換算する。

* 試料の調製は分析操作を進める上で極めて重要であり、分析目的や分析対象物によっては、分析方法による誤差よりも調製法の誤差の方が大きい場合がある。従って、分析試料の調製に当たっては十分注意をはらう必要がある。

通常、定量に用いられる試料の量は1~10 gであり、それに対して母試料の大きさは数トンであり、ほとんどの場合の分析は試料の一部分について行われ、それをもって全体の成分組成を表すこととなっている。

母試料の大小にかかわらず、実際に行われるのは、全体を多数の小区分に分けた、小部分ずつを取り出して混合する方法である。母試料から一部分を取り出す方法を縮分といい、二分器(試料縮分器)(写真上)を用いる方法と円錐四分法がある。(試料を円錐形に積み上げ、これを頂点から垂直に押し下げて平らにし、これを四等分し、相対する二つの部分を合わせて一つの試料とする方法であるが、誤差を生じ易い。)(次ページ参照)



①良く混合した試料を円すい状にまとめる



②上から垂直に四等分する



③対角ある一組を分析用として、他方は保管用又は（場合によっては）捨てる



④対角にあるものを1つにする

（４）乾物（％）について、日本標準飼料成分表のデータベース中に乾物（％）とあるが、これは、原試料中の水分以外の各成分の含有量（％）を乾物中の各成分の含有量（％）に換算しており、その換算式は次式による。

$$\text{乾物中の（各成分の）含有量（％）} = A \times \frac{100}{(100 - B)}$$

A：原試料中の（各成分の）含有量（％）

B：原試料中の水分量（％）

4 一般栄養成分

4.1 水 分

分析試料 2～5 g を正確に量ってアルミニウム製ひょう量皿（あらかじめ乾燥して重さを正確に量っておいたもの）に入れ、135±2℃で2時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量り、水分量を算出する。

ただし、フィッシュソリュブル吸着飼料、糖みつ吸着飼料及びグルテンフィードについては、乾燥温度は105±2℃、乾燥時間は3時間とする。

又、試料の水分含量が多いため粉碎することが困難な場合には、予備乾燥を行い、予備乾燥後の試料中の水分量を求め、次式により原試料中の水分量を算出する。

$$\text{原試料中の水分量 (\%)} = A + \frac{(100 - A) \times B}{100}$$

A：予備乾燥した原試料中の水分量 (%)

B：予備乾燥後の試料中の水分量 (%)

① 分析対象や分析の目的により水分の定義は異なるが、この分析法における水分は主として付着水を意味しており、分析対象の多くが有機物であること、分析の実施が容易であることなどの理由から常圧における加熱減量を水分としている。

一般に用いられている定温乾燥器内の温度分布は位置によりかなりの幅があるが、強制通風循環式の電気定温乾燥器ではその幅が比較的少ない。しかし通風が強過ぎると、ひょう量皿を置く位置によっては軽い試料が吹き飛ばされるおそれがあるので注意を要する。

水分の定量方法は加熱減量法のほかに次のような方法があるが、通常の分析検査には用いていない。

1) 蒸留法 水と混合しない有機溶媒（例えばトルエン）中で試料を加熱し、試料中の水又は水と溶媒の混合蒸気を蒸留し、これを冷却して溶媒と分離した水の容量から試料中の水分を求める。この方法は水以外の揮発成分や脂肪を多く含み、熱に安定な試料に適用される。

2) カールフィッシャー法 よう素、二酸化いおう、ピリジンの混合液であるカールフィッシャー試薬がメチルアルコールの存在下で水と定量的に反応し、よう素を消費する原理を応用したものである。

試料中に水分以外の揮発成分を含有する場合、水だけを定量できる利点がある。

3) 熱に安定な成分を含有する場合には、例えば「60～70℃、200～250mmHg（26.7～33.3kPa）」等の定温減圧下で乾燥し、その減量を水分の量とする。

② ひょう量皿はガラス製のものでもよいが、アルミニウム製のひょう量皿（三紳工業で販売されている。）の方が破損しにくい、重量が軽い、熱伝導性がよい、気密性がよい、取扱が簡易である等の利点がある。

試料を秤量してひょう量皿に入れた後、ふたをせずに皿の下、又は横に置いて乾燥器に入れる。2時間乾燥後、容器にふたをし、デシケーター中で放冷する。

③ フィッシュソリュブル吸着飼料、糖蜜吸着飼料、グルテンフィードについて常法を適用すると、水分以外の揮発性物質の揮散又は熱分解するおそれがあるので「105±2℃、3時間乾燥法」とした。

フィッシュソリュブル原液及び糖蜜等の粘液状の飼料中の水分の定量法は、通常次の方法による。

分析試料 2 g を正確に量ってアルミニウム製ひょう量皿（あらかじめ海砂[※]10～20g 及びかくはん棒を入

れ乾燥して重さを量っておく。) に入れ、沸騰水浴上で試料と海砂をよく混和した後、時々かき混ぜながら約15分間乾燥する。

次に定温乾燥器に入れ、105±2℃で3時間乾燥し、デシケーター中で放冷後重さを量り、その減量から水分量を算出する。

サイレージ等揮発性成分の多い試料ではトルエン蒸留法又は100℃、18時間加熱減量法を用いることがある。

注 海砂(ケイ砂)は350～250 μm (60～80メッシュ)のものをを用いる。これを水洗後、塩酸(1+1)で数時間加熱した後、酸がなくなるまで水洗し、乾燥してデシケーター中に保存する。

また、粘度の高い液体の場合は、ろ紙に吸着させて乾燥し、その減量から水分量を算出する。

4.2 粗たん白質

試薬の調製

0.1mol/L水酸化ナトリウム標準液(市販の0.1mol/Lの水酸化ナトリウムを使用しても良い。) 水酸化ナトリウムの飽和溶液を調製し、栓をして10日間以上放置した後、上澄み液50mLに煮沸冷却した水を加えて10Lとし、0.1mol/L水酸化ナトリウム標準液を調製し、次によりその濃度を標定する。

アミド硫酸(標準試薬)(デシケーター(減圧)中で48時間乾燥したもの) 2～2.5gを正確に量って250mLのメスフラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてアミド硫酸標準液を調製する。アミド硫酸標準液25mLを200mLの三角フラスコに正確に入れ、ブロモチモールブルー試液数滴を加え、0.1mol/L水酸化ナトリウム標準液で滴定し、次式により0.1mol/L水酸化ナトリウム標準液の係数を算出する。

$$0.1\text{mol/L水酸化ナトリウム標準液の係数}(f_1) = \frac{W \times 10^4}{V \times 97.10}$$

W: 標定に用いたアミド硫酸標準液(25mL)中のアミド硫酸の重量(g)

V: 滴定に要した0.1mol/L水酸化ナトリウム標準液の量(mL)

注 97.10は硫酸アミドの分子量

0.05mol/L硫酸標準液(市販の0.05mol/Lの硫酸を使用しても良い。) 硫酸28mLを水1Lにかき混ぜながら徐々に加え、放冷後、水を加えて10Lとして0.05mol/L硫酸標準液を調製し、次によりその濃度を標定する。

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

$$0.05\text{mol/L硫酸標準液の係数}(f_2) = \frac{V \times f_1}{25}$$

f₁: 0.1mol/L水酸化ナトリウム標準液の係数

V: 滴定に要した0.1mol/L水酸化ナトリウム標準液の量(mL)

注 25は、三角フラスコに入れた0.05mol/L硫酸標準液の容量。

試料溶液の調製

分析試料1～5gを正確に量ってケルダールフラスコに入れ、硫酸カリウム9g及び硫酸銅(Ⅱ)五水和物1gを加え、更に硫酸30～40mLを加えて振り混ぜ、徐々に加熱し、あわが生じなくなってから強熱し、内容液が透明になった後、更に2時間以上加熱する。放冷後、内容液を水で250mLのメスフラスコに移し、標線まで水を加えて試料溶液とする。

定 量

1) 硫酸標準液に吸収させる方法

試料溶液の一定量をケルダールフラスコに正確に入れ、強アルカリ性とするのに十分な量の水酸化ナトリウム溶液(50w/v%)を加え、これをあらかじめ0.05mol/L硫酸標準液の一定量を正確に入れた受器を接続した水蒸気蒸留装置に連結して120mL程度になるまで留出させる。

留出液にメチルレッド試液を数滴加え、0.1mol/L水酸化ナトリウム標準液で滴定し、次式により窒素〔N〕量を算出する。これに6.25を乗じて粗たん白質量を算出する。

$$\text{窒素〔N〕量 (\%)} = 1.04 \times f_1 \times (V_1 - V_2) \times \frac{250}{V} \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

f_1 : 0.1mol/L水酸化ナトリウム標準液の係数

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

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

V : 蒸留に用いた試料溶液の量 (mL)

W : 分析に用いた試料の重量 (g)

2) ほう酸溶液に吸収させる方法

受器に0.05mol/L硫酸標準液の代わりにほう酸溶液4(w/v%)を一定量を入れ、1)と同様に蒸留操作を行う。

留出液にブロムクレゾールグリーン-メチルレッド試液を数滴加え、0.05mol/L硫酸標準液で滴定し、次式により窒素〔N〕量を算出する。これに6.25を乗じて粗たん白質量を算出する。

$$\text{窒素〔N〕量 (\%)} = 1.04 \times f_2 \times V_1 \times \frac{250}{V} \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

f_2 : 0.05mol/L硫酸標準液の係数

V_1 : 滴定に要した0.05mol/L硫酸標準液の量 (mL)

V : 蒸留に用いた試料溶液の量 (mL)

W : 分析に用いた試料の重量 (g)

① ケルダール法によって試料中の窒素全量を定量し、これに6.25を乗じて得たものを粗たん白質としている。従って、カゼイン等の乳製品の原料の粗たん白質は過小に、小麦粉や大豆では過大に測定される。

本法では硝酸性窒素、亜硝酸性窒素は定量されない。

近年、硫酸分解によるケルダール法を応用し、定量操作の迅速化を図るため、自動化された装置が開発されている。

- 1) ケルテックオートシステム（自動窒素蛋白分析装置）Tecator製
- 2) ケルダール法窒素/蛋白質定量装置 三田村理研工業製。
- 3) ケルダール窒素分析装置システム36 柴田科学器械工業製
- 4) 窒素・タンパク質分析装置macro N 日本シイベルヘグナー販売

これらの装置を使用する場合には試料の種類、粗たん白質含有量、最適濃度範囲、使用目的等に十分留意すべきである。

またDumas法による窒素ガスを測定する方法は、ケルダール法では定量できない硝酸性窒素、亜硝酸製窒素のほかジアゾ、シアン、ニトリル、ニトロソ、アゾオキシ等の窒素も定量される。

② 水酸化ナトリウムは吸湿性が強く、かつ炭酸の影響も受けやすいため理論的に正しい濃度のものを得ることは難しい。この炭酸の影響を避けるため飽和溶液（水酸化ナトリウムの濃厚溶液はほとんど二酸化炭素を含まない）を利用する。

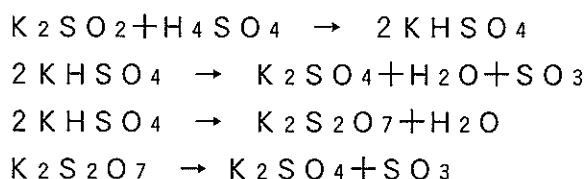
水酸化ナトリウムは20℃で74mLの水に約80g 溶けるので、これよりやや過剰の水酸化ナトリウムを入れた飽和溶液を調製して静置し、清澄な部分をとって使用するとよい（20℃で約20mol/Lの濃度である）。

③ 指示薬は、メチルレッドーメチレンブルー混合試液（メチルレッド0.2 g 及びメチレンブルー0.1 g をそれぞれエタノール（90 v/v %）に溶かして100mLとしたものを混合する。）を用いてもよい。この混合試液を用いて滴定した場合には、赤紫色から青色を経て緑色となった時を終点とする。

④ 硫酸カリウム及び硫酸銅は分解促進剤として用いる。

ケルダール分解の際の分解促進剤には、1) 硫酸銅ー硫酸カリウム、2) 硫酸銅ーセレンー硫酸カリウム、3) 二酸化チタンー硫酸銅ー硫酸カリウム、4) 酸化第二水銀ー硫酸カリウム、その他があるが、環境汚染防止対策及び同一試料液をりん比色定量に使用する場合の分解促進剤の影響等によるトラブルを避けるため、硫酸銅ー硫酸カリウムのみを分解促進剤として採用した。

硫酸銅は分解を促進する触媒であり、硫酸カリウムは硫酸濃度とその沸点を高め、また次のような反応により分解を促進する。

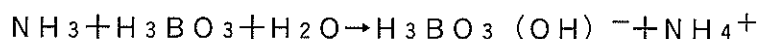


⑤ 植物油かす等油分の多い試料は、加熱が強いと急激に泡立ちケルダールフラスコからあふれるおそれがあるので注意を要す。泡立ちが激しいときは、いったん加熱を止め、しばらく放置してから再度火力を弱めにして加熱する。また、泡立ちが激しい試料には少量のパラフィンを添加する。

⑥ 0.1mol/L水酸化ナトリウム標準液 1 mLは1.40mgの窒素に相当する。

0.05mol/L硫酸標準液 1 mLは1.40mgの窒素に相当する。

⑦ 本法は日本薬局方、JIS、食品分析等に広く用いられている方法である。アルカリ性とした試料溶液から発生するアンモニア（NH₃）が希薄なほう酸溶液に通じる時、下式のように完全に解離するため、それを強酸で滴定する方法である。



ほう酸の量は滴定に直接関与しないので、ほう酸溶液の濃度及びほう酸溶液採取量を厳密に規定する必要がないという長所がある。

また、ほう酸溶液中にあらかじめメチルレッド・ブロムクレゾールグリーン試液を混ぜておくと便利である。

ほう酸400 g、0.1%ブロムクレゾールグリーンエタノール溶液100mL及び0.1%メチルレッドエタノール溶液70mLを水10Lに溶かして調製する。

弱酸であるほう酸にアンモニアを吸収させる。ほう酸の濃度は3%以上でアンモニアを十分キャッチできるが、安全を見込んで4%としている。

また、受器中のほう酸溶液は40℃を超えないように注意する。高温になるとアンモニアの吸収が悪くなり、損失の原因となる。

4.3 粗脂肪

分析試料2～5 gを正確に量って円筒ろ紙（直径22mm、高さ90mm）（No.84（東洋濾紙製）又はこれと同等のもの）に入れ、その上に脱脂綿を軽く押えるようにして入れた後、95～100℃で2時間乾燥する。

これをソックスレー抽出器（同等の抽出効果のある装置を用いてもよい。）に入れ、脂肪ひょう量瓶（あらかじめ95～100℃で乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの）に連結し、ジエチルエーテルを加えて16時間抽出する。冷却管から1分間に80滴程度エーテルが滴下するように湯煎又はヒーターを調節する（1時間に16～20回循環する程度）。

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

※ 試料の脂肪含量が多いため粉碎することが困難な場合には、「V3(3)」により分析試料を調製した後、次により原試料中の粗脂肪量を求める。

予備抽出に用いたジエチルエーテルを入れたメスフラスコの標線までジエチルエーテルを加え、その一定量を脂肪ひょう量瓶（あらかじめ95～100℃で乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの）に正確に入れ、上記定量法に準じて、予備抽出した原試料中の粗脂肪量を求める。

次に、予備抽出後の試料中の粗脂肪量を上記定量法によって求め、次式により原試料中の粗脂肪量を算出する。

$$\text{原試料中の粗脂肪量 (\%)} = A + \frac{(100 - B) \times C}{100}$$

A：予備抽出した原試料から得られた粗脂肪量 (%)

B：予備抽出による減量 (%)

C：予備抽出後の試料中の粗脂肪量 (%)

①ソックスレー脂肪抽出装置を用いて、試料をエーテルで抽出し、得られた抽出物を粗脂肪としている。

粗脂肪中には脂肪のほかに脂肪性色素（クロロフィル、カロチノイド等）、ろう、遊離脂肪酸、レシチン、コレステリン、りん脂質等が含まれる。

②あらかじめろ紙に分析試料を計り取ってから円筒ろ紙に入れると、抽出後の分析試料の除去操作が比較的容易となる。

③分析試料の上に脱脂綿を詰める理由は、エーテルを全体に浸透させ、また、試料が円筒ろ紙の上部から流出しないようにするためである。

4.4 粗繊維

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

酸不溶解物を水 130～140mL で先のトールビーカーに移し、水酸化ナトリウム溶液（5 w/v%）50mL を加え、更に水を加えて 200mL とする。

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

酸・アルカリ不溶解物をろ紙（5 種 A）（あらかじめアルミニウム製ひょう量皿に入れ、 $135\pm 2^{\circ}\text{C}$ で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの）でろ過し、ろ液のアルカリ性反応がなくなるまで熱水で洗浄し、更に少量のエタノール及びジエチルエーテルで順次 2～3 回ずつ洗浄した後、3～4 時間風乾する。

次に、酸・アルカリ不溶解物をろ紙とともに先のアルミニウム製ひょう量皿に入れ、 $135\pm 2^{\circ}\text{C}$ で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量り、酸・アルカリ不溶解物の量を算出する。アルミニウム製ひょう量皿の内容物をるつぼ（あらかじめ $550\sim 600^{\circ}\text{C}$ で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの）に入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、 $550\sim 600^{\circ}\text{C}$ で 2 時間加熱して灰化し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量って灰分量を求める。

酸・アルカリ不溶解物の量より灰分量を差し引いて試料中の粗繊維量を算出する。

4.5 粗灰分

分析試料 2～5 g を正確に量って、るつぼ（あらかじめ $550\sim 600^{\circ}\text{C}$ で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの）に入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、 $550\sim 600^{\circ}\text{C}$ で 2 時間加熱して灰化し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量って試料中の粗灰分量を算出する。

① 試料を加熱灰化したものを粗灰分としている。純灰分のほかに有機物の燃え尽くさないで残存する炭素もあり、また有機物の酸化によって生じた炭酸塩も存在する。

② 灰化容器は磁製、白金製、パイレックス製いずれでもよいが、粗灰分を定量した後、その灰化物を他の元素分析に用いる場合は、その目的により白金製を用いた方がよい場合がある。磁製のるつぼは内径約 40mm、高さ約 37mm 程度のものでよい。

③ 糖分の多い飼料や動物質飼料では、炭化の際に膨化してるつぼの外にあふれ出ることがあるので注意して加熱する。

④ 放冷時間は予備焼き放冷の時間と同一とする。

注 国際標準（ISO）による粗灰分の定量法

分析試料約 5 g を 0.001 g の単位まで正確に秤り、灰化皿（るつぼ）（あらかじめ 550℃ で 30 分間以上加熱し、デシケーターで放冷後、0.001 g の単位まで正確に秤っておいたもの）に入れる。

試料を入れた灰化皿（るつぼ）をホットプレート又はガスバーナーで徐々に加熱して炭化させる。この灰化皿（るつぼ）をあらかじめ 550℃ に設定しておいたマッフル炉に入れ 3 時間加熱し、灰化皿中の灰分に炭化物の粒が存在する場合には、その灰化皿（るつぼ）をマッフル炉の中に入れ、更に 1 時間加熱する。それでも炭化物の粒が確認される場合には、その灰分を放冷した後、水を入れ湿らし、乾燥器（103±2℃）に入れて乾燥させ、マッフル炉に入れ 1 時間加熱する。

この灰化皿（るつぼ）をデシケーター中で放冷し、0.001 g の単位まで正確に秤って粗灰分量を算出する。

4.6 可溶無窒素物

可溶無窒素物量は、次式により算出する。

$$\text{可溶無窒素物量 (\%)} = 100 - (\text{水分量 (\%)} + \text{粗たん白質量 (\%)} \\ + \text{粗脂肪量 (\%)} + \text{粗繊維量 (\%)} + \text{粗灰分量 (\%)})$$

注 可溶無窒素物 (nitrogen free extracts: N F E) は、主としてでん粉、糖 類、有機酸、リグニン等である。

4.7 非構造化炭水化物 (NCWFE)

糖・デンプン・有機酸類を言う。

$$\text{NCWFE} = [\text{有機物}] - ([\text{粗蛋白質}] + [\text{粗脂肪}] + [\text{粗蛋白質を含まない総繊維}])$$

ここでは、総繊維としてOCWを用いる。

また、NCWFEをOCWから推定する回帰式は、

$$\text{NCWFE} = 81.4 - 1.252 \times \text{OCW} \text{ (畜産試験場) である。}$$

注 NCWFEと似た成分としてNFC (又はNSC) [非構造化炭水化物] がある。

(NFCとNSCは全く同じ成分を意味している。一般にNFCの方がより用いられている。)

NFCの算出式は、

$$\text{NFC} = [\text{有機物}] - ([\text{粗蛋白質}] + [\text{粗脂肪}] + [\text{粗蛋白質を含まない総繊維}])$$

であり、NCWFEと式は同じであるが、NFCの場合総繊維としてNDFを用いることが異なる。

つまり、NCWFEとNFEの相違は総繊維の違い、OCWとNDFの性質の違いに起因する (詳細は [III3.2] 参照)。

また、畜産試験場により、OCW及びNDFからNFCを推定する回帰式が示されている。

$$\text{NFC} = 78.4 - 1.071 \times \text{OCW} \text{ (畜産試験場)}$$

$$\text{NFC} = 71.2 - 0.958 \times \text{NDF} \text{ (畜産試験場)}$$

【粗蛋白質を含まない総繊維の測定方法】

①NDFの場合 分析試料により5.2.1～5.2.2の「…水で十分洗浄し、更に少量のアセトンで3～4回洗浄した後、風乾する。」までの操作を行う。

②OCWの場合 分析試料により6.1.1～6.1.3の「…水で十分洗浄し、更に少量のアセトンで3～4回洗浄した後、風乾する。」までの操作を行う。

次に残さをろ紙ごとケルダールスラスコに入れ、以下4.2に従い、残さ中の粗蛋白質量を算出する。

$$[\text{粗蛋白質を含まない総繊維}] = [\text{NDF(OCW)}] - [\text{その残さ中の粗蛋白質}]$$

5 デタージェント成分

5.1 酸性デタージェント繊維 (ADF)

分析試料 1～2 g を正確に量って 500 mL のトールビーカーに入れ、酸性デタージェント溶液 (0.5 mol/L 硫酸 1 L に臭化セチルトリメチルアンモニウム 20 g を加えて溶解する。) 及び消泡剤としてデカリンを数滴加える。

次に、トールビーカーを時計皿又は冷却器で覆い、蒸発する水分を補いながら 1 時間煮沸する。ろ紙 (5 種 A) (あらかじめアルミニウム製ひょう量皿に入れ、 $135 \pm 2^\circ\text{C}$ で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの) でろ過し、水で十分洗浄し、更に少量のアセトンで 3～4 回洗浄した後、風乾する。

次に、残さをろ紙とともに先のアルミニウム製ひょう量皿に入れ、 $135 \pm 2^\circ\text{C}$ で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量り ADF とけい酸の量を算出する。アルミニウム製ひょう量皿の内容物をつぼ (あらかじめ $550 \sim 600^\circ\text{C}$ で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの) に入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、 $550 \sim 600^\circ\text{C}$ で 2 時間加熱して灰化し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量って灰分 (けい酸) 量を求める。

先に算出した残さの量より灰分量を差し引いて試料中の ADF 量を算出する。

注 0.5 mol/L の硫酸に界面活性剤を溶解させた処理液 (Acid Detergent, AD) で試料を煮沸すると、まず界面活性剤の作用で蛋白質、可溶性炭水化物、脂質等の溶液中への分散が起こり、ついでそれらが酸で分解されると同時にヘミセルロース、セルロースも加水分解を受ける。この時、ヘミセルロースのほとんどの部分は加水分解を受け流出するが、セルロースの結晶領域は分解されない。また、リグニンも分解されない。したがってこの処理により得られた残さは、有機物ではリグニンとセルロースが主であり、その他少量のタンパク質を含む。無機物ではけい酸を含む。この処理残さの有機物部分を 酸性デタージェント繊維 (Acid Detergent Fiber, ADF) と呼ぶ。処理残さのセルロースを分解して除き、更に残さを灰化してリグニンとけい酸を分離する。AD 処理残さを 72% 硫酸で処理して得られるリグニンを酸性デタージェントリグニン (Aciddetergent lignin, ADL) といい、また、AD 処理残さに含まれる窒素は通常 ADN と呼ばれている。

分析操作は、粗繊維定量に準じて行う。

5.2 中性デタージェント繊維 (NDF)

試薬の調製

α -アミラーゼ溶液 α -アミラーゼ 1 mg をりん酸緩衝液（りん酸 1 カリウム 60.4 g 及びりん酸 2 ナトリウム 19.9 g を水に溶かして 5 L とし、pH を 5.8 に調整する。）20 mL に溶解する。使用直前に調製する。

中性デタージェント溶液 ドデシル硫酸ナトリウム 150 g，EDTA-2 Na 93.1 g，ほう酸ナトリウム 34.1 g，りん酸 2 ナトリウム 57.4 g 及びエチレングリコールモノエチルエーテル 50 mL を水に溶かして 5 L とする。

5.2.1 でんぷんを含む飼料の場合

分析試料 0.5～1 g を正確に量って 300 mL の三角フラスコに入れ、水 20 mL を加えてホットプレート上で加熱し、煮沸させて、でんぷんを糊化させる。冷却後、 α -アミラーゼ溶液 20 mL を加え、振とう培養器に入れ、40℃ で 16 時間ででんぷん加水分解を行う。加水分解後、残さをろ紙（5 種 A）でろ過し、水で 3～4 回洗浄する。

次に、ポリエチレン洗浄びんに入れた中性デタージェント溶液を吹き付け、500 mL のトールビーカーに洗い込み、中性デタージェント溶液の液量を約 100 mL とし、消泡剤としてデカリンを数滴加え、時計皿又は冷却器で覆い、蒸発する水分を補いながら 1 時間煮沸する。内容物をろ紙（5 種 A）（あらかじめアルミニウム製ひょう量皿に入れ、135±2℃ で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの）でろ過し、水で十分洗浄し、更に少量のアセトンで 3～4 回洗浄した後、風乾する。

次に、残さをろ紙とともに先のアルミニウム製ひょう量皿に入れ、135±2℃ で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量り CW（細胞壁成分）を算出する。アルミニウム製ひょう量皿の内容物をつぼ（あらかじめ 550～600℃ で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの）に入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、550～600℃ で 2 時間加熱して灰化し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量って灰分量を求める。

先に算出した CW の含量より灰分量を差し引いて試料中の NDF 量を算出する。

5.2.2 でんぷんを含まない飼料の場合

分析試料 0.5～1 g を正確に量って 500 mL のトールビーカーに入れ、中性デタージェント溶液 100 mL 消泡剤としてデカリンを数滴加え、以下 5.2.1 と同様に操作を行う。

注 飼料を中性界面活性剤で煮沸することにより、細胞内の糖類、蛋白質、脂質等を乳化溶解させて細胞壁物質から分離し、更に灰分を除いて残った繊維成分が中性デタージェント繊維（Neutral Detergent Fiber NDF）であり、主に細胞壁を構成するセルロース、ヘミセルロース、リグニンからなる。

また、オーチャードグラス、チモシーなどの牧草等、でんぷんの含量がゼロ又は無視できる程度のものについては本法を適用する。

6 酵素法による成分

6.1 細胞壁物質 (OCW)

6.1.1 でんぷんを含む飼料の場合

試薬の調製

α -アミラーゼ溶液 リン酸緩衝液 (A) 20mL に α -アミラーゼ (和光社製) を 1mg の割合で溶かした後、酢酸カルシウム溶液 5mL/L の割合で加える。

リン酸緩衝液 (A) リン酸 1 カリウム [KH_2PO_4] 60.4 g とリン酸 2 ナトリウム ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 19.9 g を水に溶かして 5L にして、pH 5.8 に調製する。

酢酸カルシウム溶液 酢酸カルシウム [$\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$] 7.0 g を水に溶かして 1L とする。

アクチナーゼ溶液 リン酸緩衝液 (B) にアクチナーゼ (科研製薬製) を 0.02% (W/V) の割合で溶かした後、酢酸カルシウム溶液 5mL/L の割合で加える。

リン酸緩衝液 (B) リン酸 1 カリウム [KH_2PO_4] 9.0 g とリン酸 2 ナトリウム ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 95.4 g を水に溶かして 5L にして、pH 7.4 に調製する。

分析操作

分析試料 0.5～1 g を正確に量って 300mL の三角フラスコに入れ、水 20mL を加えてホットプレート上で加熱し、煮沸させてでんぷんを糊化させる。冷却後、 α -アミラーゼ溶液 20mL を加え、振とう培養器に入れ、40℃ で 16 時間でんぷん加水分解を行う。加水分解後、残さをろ紙 (5 種 A) でろ過し、水で 3～4 回洗浄する。

次に、ポリエチレン洗浄びんに入れたアクチナーゼ溶液を吹き付け、50mL のポリサンプルビンに洗い込み、アクチナーゼ溶液でビンを満たす。ビンに栓とゴムバンドを施し、振とう培養器中で 40℃ で 16 時間蛋白質分解を行う。内容物をろ紙 (5 種 A) (あらかじめアルミニウム製ひょう量皿に入れ、135±2℃ で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの) でろ過し、水で十分洗浄し、更に少量のアセトンで 3～4 回洗浄した後、風乾する。

次に、残さをろ紙とともに先のアルミニウム製ひょう量皿に入れ、135±2℃ で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量り CW (細胞壁成分) を算出する。アルミニウム製ひょう量皿の内容物をつぼ (あらかじめ 550～600℃ で 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの) に入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、550～600℃ で 2 時間加熱して灰化し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量って灰分量を求める。

先に算出した CW の含量より灰分量を差し引いて試料中の OCW 量を算出する。

6.1.2でんぷんを含まない飼料の場合

分析試料0.5～1 gを正確に量って50mLのポリサンプルビンに入れ、アクチナーゼ溶液でビンを満たす。以下6.1.1と同様に操作を行う。

6.1.3でんぷんを含む飼料の場合の簡易法

試薬の調製

α -アミラーゼ・アクチナーゼ酢酸溶液 α -アミラーゼ・アクチナーゼ緩衝液20mLに対し、 α -アミラーゼ1mg及びアクチナーゼ8mgを溶かした後、酢酸カルシウム溶液5mL/Lの割合で加える。

α -アミラーゼ・アクチナーゼ緩衝液 酢酸ナトリウム $[\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 63.2gを水に溶かし、酢酸 $[\text{CH}_3\text{COOH}]$ 2.1gを加え5Lとして、pH5.8に調製する。

分析操作

この操作は、 α -アミラーゼ及びアクチナーゼ処理を同時に行う方法である。

でんぷんの糊化までは、6.1.1と同様の操作を行い、20mLの α -アミラーゼ・アクチナーゼ酢酸溶液を加え、40℃の振とう培養器で16時間ででんぷんの加水分解及び蛋白質の分解を同時に行う。以下6.1.1と同様に操作を行う。

6.2 低消化性繊維

試薬の調製

セルラーゼ溶液 酢酸緩衝液にセルラーゼ（ヤクルト製）を1%（W/V）の割合で溶解する。

酢酸緩衝液 酢酸ナトリウム $[\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 12.9 gを水に溶かし、酢酸 $[\text{CH}_3\text{COOH}]$ 24.3 gを加え5Lとして、pH4.0に調製する。

分析操作

分析試料を細胞壁物質（CW）0.3gに相当量を正確に量って、でんぷんの有無に応じて6.1.1～6.1.3の蛋白質の分解までの操作を行い、分解後、残さをろ紙（5種A）でろ過し、水で3～4回洗浄する。

次に、ポリエチレン洗浄びんに入れたセルラーゼ溶液を吹き付け、50mLのポリサンプルビンに洗い込み、セルラーゼ溶液でビンを満たす。ビンに栓とゴムバンドを施し、振とう培養器中で40℃で4時間セルロース及びヘミセルロースの分解を行う。内容物をろ紙（5種A）（あらかじめアルミニウム製ひょう量皿に入れ、135±2℃で2時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの）でろ過し、水で十分洗浄し、更に少量のアセトンで3～4回洗浄した後、風乾する。

次に、残さをろ紙とともに先のアルミニウム製ひょう量皿に入れ、135±2℃で2時間乾燥し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量った後、アルミニウム製ひょう量皿の内容物をるつぼ（あらかじめ550～600℃で2時間加熱し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量っておいたもの）に入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、550～600℃で2時間加熱して灰化し、デシケーター中で放冷後、重さを正確に量って灰分量を求める。先に算出した酵素処理残さから灰分量を差し引いて試料中のOb量を算出する。

7 硝酸及び亜硝酸態窒素

7.1 高速液体クロマトグラフ法

試薬の調製

りん酸緩衝液 りん酸水素二ナトリウム・12水1.79 g, りん酸二水素ナトリウム2水0.78 g 及び過塩素酸ナトリウム1水14.04 g を水に溶かして1 Lとする。

混合標準液 硝酸ナトリウム（105℃で3～4時間乾燥したもの）0.607 g 及び亜硝酸ナトリウム（105℃で3～4時間乾燥したもの）0.493 g を正確に量って、100 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加て混合標準原液を調製する（この液1 mLは、硝酸態窒素として1 mg、亜硝酸態窒素として1 mgを含有する。）。

使用に際して、この原液の一定量をりん酸緩衝液で正確に希釈し、1 mL中に0.5 µg, 1 µg, 2 µg, 5 µg, 10 µg及び20 µgを含有する各混合標準液を調製する。

注 標準液、試料溶液及び溶離液に使用する溶媒は、HPLC用試薬とする（水の場合は、アドバンテックCPW-101超純水器（導電率2 MW・cm）で調製したものでも良い。）。

分析操作

抽出 分析試料5～10 g を正確に量って500 mLの共栓三角フラスコに入れ、りん酸緩衝液 250 mLを加え、20分間振り混ぜて抽出した後、ろ紙（5種A）でろ過する。ろ液の一定量をりん酸緩衝液で正確に希釈し、メンブランフィルター（孔径0.5 µm以下）でろ過し、高速液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

高速液体クロマトグラフィー 試料溶液及び混合標準液各20 µLを高速液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検出器：紫外吸光光度検出器（測定波長：210 nm）

カラム：Asahipak NH2P-50 4E（内径4.6 mm, 長さ250 mm, 粒径5 µm）又はこれと同等のもの

溶離液：りん酸緩衝液

流速：0.8 mL/min

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中の亜硝酸態窒素量を算出する。

注 牛が硝酸塩含量の高い乾牧草を摂取した場合に中毒症状が散見されている。亜硝酸態窒素は、その直接の原因物質で主に急性中毒を起こすとされ、硝酸態窒素は、間接的原因物質で慢性中毒を起こすとされている。とうもろこし、ソルガム、スーダングラス、イタリアンライグラス、ライ麦等は生育過程の初期から中期にかけて茎葉部に硝酸塩を蓄積し易い。これら植物中の硝酸塩は家畜の第一胃で微生物の作用で還元されて亜硝酸塩からヒドロキシアミンを経て、最終的にはアンモニアとなり微生物に利用される。

しかし、摂取する硝酸塩が過剰の場合は血液中にも取り込まれ、酸素欠乏に陥り重傷の場合には死亡に至る。硝酸態窒素摂取の許容限界量は、0.111 g/kg・体重（1日の摂取量）、飼料中の濃度として0.2%程度とされている。

られていた。

HPLCの溶離液としてりん酸緩衝液を用いていることから同溶媒で抽出を行っているが、水を用いて抽出を行っても特に問題はない。

7.2 キャピラリー電気泳動法

試薬の調製

混合標準液 硝酸ナトリウム (105℃で3～4時間乾燥したもの) 0.607 g 及び亜硝酸ナトリウム (105℃で3～4時間乾燥したもの) 0.493 g を正確に量って、100mLのメスフラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加て混合標準原液を調製する(この液1 mLは、硝酸態窒素として1 mg、亜硝酸態窒素として1 mgを含有する。)。使用に際して、この原液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL中に0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 5 μ g, 10 μ g及び20 μ gを含有する各混合標準液を調製する。

注 水は、アドバンテックCPW-101超純水器 (導電率2MW $\cdot$ cm) で調製したものを用いる。

分析操作

抽出 分析試料5～10 g を1,000mLのねじ付き広口びんに入れ、水500mLを加え、振り混ぜる。抽出液をガーゼでろ過した後、ろ紙 (No5A) でろ過し、限外ろ過フィルター (分画分子量30,000) (ミリポア製ULTRAFREE-MC (UFC3BTK)) で除たん白を行い、キャピラリー電気泳動に供する試料溶液とする。

キャピラリー電気泳動 試料溶液及び各種混合標準液をキャピラリー電気泳動装置に注入し、エレクトロフェログラムを得る。

測定条件 1

装置：アジレントテクノロジー (旧ヒューレットパッカード製G1600A型キャピラリー)

電気泳動システムカラム：フューズドシリカキャピラリー (全長 80.5cm $\times$ 内径50 μ m (有効長72cm))

溶離液：7.5mM PTC/0.5mM CTAH [adjusted with 1N NaOH] (pH6.0)

PTC：trans-1,2,3Propen triCarboxylic acid (和光社製)

CTAH：n-Hexadecyl trimethylammonium hydroxide (東京化成社製)

測定波長：UV間接吸光検出 (シグナル側330nm, リファレンス側235nm)

印加電圧：-25kV

キャピラリー温度：20℃

試料注入法：加圧法 (50mbar, 12秒間)

測定条件 2

装置：アジレントテクノロジー (旧ヒューレットパッカード製G1600A型キャピラリー)

電気泳動システムカラム：フューズドシリカキャピラリー (全長 64.5cm $\times$ 内径75 μ m (有効長56cm))

溶離液：88mM 四ホウ酸ナトリウム [adjusted with 0.1N HCL] (pH9.0)

測定波長：UV間接吸光検出 (シグナル側330nm, リファレンス側235nm)

印加電圧：-15kV

キャピラリー温度：20℃

試料注入法：加圧法 (50mbar, 8秒間)

8 有 機 酸

試薬の調製

混合標準液 ギ酸、プロピオン酸、乳酸、酢酸、n-酪酸、iso-酪酸、n-吉草酸、iso-吉草酸、n-カプロン酸及びiso-カプロン酸を水に溶かし、各有機酸として1,000mg/mLの各種標準原液を調製する。使用に際し、これら原液を水で正確に希釈し、1mL中にそれぞれ25、50、75及び100 μ g/mLの混合標準液を調製する。

注1 ギ酸、プロピオン酸、乳酸及び酢酸は、和光純薬工業製。

注2 n-酪酸、iso-酪酸、n-吉草酸、iso-吉草酸、n-カプロン酸及びiso-カプロン酸は、東京化成工業製。

注3 水は、アドバンテックCPW-101超純水器（導電率2MW $\cdot$ cm）で調製したものをを用いる。

分析操作

細切したサイレージ5～10 gを1,000mLのねじ付き広口びんに入れ、水500mLを加え、冷蔵庫中で時々振り混ぜながら一夜放置した。抽出液をガーゼでろ過した後、ろ紙（No5A）でろ過し、限外ろ過フィルター（分画分子量30,000）（ミリポア製ULTRAFREE-MC（UFC3BTK））で除たん白を行い、キャピラリー電気泳動に供しエレクトロフェログラム。

測定条件例

装 置：アジレントテクノロジー（旧ヒューレットパカード製G1600A型キャピラリー）

電気泳動システムカラム：フューズドシリカキャピラリー（全長112.5cm $\times$ 内径50 μ m（有効長104cm））

溶 離 液：有機酸分析用バッファー

測定波長：UV間接吸光検出（シグナル側350nm、リファレンス側220nm）

印加電圧：-30kV

キャピラリー温度：20 $^{\circ}$ C

試料注入法：加圧法（50mbar,6秒間）

9 ミネラル成分

9.1 カリウム

試薬の調製

干渉抑制剤液 炭酸カルシウム12.5 g を量ってビーカーに入れ、少量の水を加え、更に塩酸105mLを徐々に加えて煮沸し、放冷後、水を加えて1 Lとする。カリウムは共存物質の影響が高いため干渉抑制剤を加える。特にNaが多量に共存している場合は、その干渉を受け、真の値より高く測定される場合がある。カリウム標準液（市販のカリウム標準液（1000mg/L）を使用しても良い） 塩化カリウム（白金るつぼ中で400～500℃で40～50分間加熱したもの）1.907 g を量って1,000mLのメスフラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてカリウム標準原液を調製し、ポリエチレン瓶に保存する（この液1 mLは、カリウム〔K〕として1 mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を水及び最終液量の1/10容量の干渉抑制剤液で正確に希釈し、1 mL中に5 μg, 10 μg, 20 μg及び30 μgを含有する各カリウム標準液を調製する。

注 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

試料溶液の調製

分析試料2～10 g を正確に量って白金皿に入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、500℃以下で加熱して灰化する。

灰化物に少量の水を加え、100mLのトールビーカーに入れ、塩酸10mLを除々に加え、数分間煮沸した後放冷し、水で250mLのメスフラスコに移し、標線まで水を加え、ろ紙（6種）でろ過し、試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

分析操作

試料溶液の一定量（カリウムとして3 mg以下）を100mLのメスフラスコに正確に入れ、干渉抑制剤液10mLを加え、標線まで水を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フラーム中で波長766.5nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

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

9.2 カルシウム

試薬の調製

干渉抑制剤液 塩化ストロンチウム6水152.1 g を水及び塩酸420mLに溶かして1 Lとする。

カルシウム標準液 (市販のカルシウム標準液(1000mg/L) を使用しても良い) 炭酸カルシウム(180℃で1時間乾燥したもの) 2.497 g を量って1,000mLのメスフラスコに入れ、塩酸(1+3) 20mLを加えて溶かし、更に標線まで水を加えてカルシウム標準原液を調製する(この液1 mLは、カルシウム[Ca]として1 mgを含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量を水及び最終液量の1/10容量の干渉抑制剤液で正確に希釈し、1 mL中に5 µg, 10 µg, 20 µg及び30 µgを含有する各カルシウム標準液を調製する。

注 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

試料溶液の調製

分析試料2~10 g を正確に量って、100mLの硬質トールビーカーに入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、550~600℃で加熱して灰化する。

放冷後、灰化物を少量の水で潤し、塩酸10mLを徐々に加え、更に水を加えて30mLとし、時計皿で覆って30分間煮沸した後放冷し、水で250mLのメスフラスコに移し、標線まで水を加え、ろ紙(6種)でろ過して試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

分析操作

試料溶液の一定量(カルシウムとして0.5~3 mg 相当量)を100mLのメスフラスコに正確に入れ、干渉抑制剤液10mLを加え、更に標線まで水を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フラーム中で波長422.7nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各カルシウム標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のカルシウム量を算出する。

カルシウム含有量が比較的少ない試料に適した測定法であるが、共存物質の干渉(特に陰イオンによる負の干渉)を無視できない場合が多い。本法では干渉抑制剤を加えることにより共存物質の干渉を軽減させている。試料溶液に多量のりんが存在し、干渉抑制剤を加えても原子吸光光度法による定量が困難な場合には、しゅう酸アンモニウム法で行う。

米ぬか、とうもろこし等の飼料原料でP > Caの場合はストロンチウム又はランタンを添加しないと干渉抑制はできない。

灰化試料を用いた塩酸試料溶液中では試料中のP化合物はすべてりん酸となっているため、アセチレン-空気炎中ではりん酸はCaと耐火性の化合物を生成するためCaの原子吸光は負の干渉をうける。

この干渉を除去するため、Caよりもりん酸と耐火性化合物を作りやすいSrやLaを干渉抑制剤として添加する。P、Si、Fe、Al、Mg、SO₄、Cl、ClO₄、NO₃等の妨害成分が多量に存在し十分除去できない場合にはしゅう酸アンモニウム法によらなければならない。

特に穀類、茎葉類は試料中にP及びSiの量が多いのでこれを除去しない場合には原子吸光光度法は適当

干渉抑制剤は、塩化ストロンチウム6水和物〔 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 〕152.1gを適量の水に溶かした後、濃塩酸416.6mLを加え、水を加えて1Lとする。

なお、塩化ランタン溶液（ランタン〔La〕として 10 ± 0.3 （w/v）%）を用いても良い。その場合、最終液量の2（v/v）%を加える。

Sr又はLaの添加はフレイム中で難解離性のCa塩の生成（特に PO_4 塩）を防止するためである。この効果はLaの方が大きくLa濃度0.2%及びSr濃度0.5%で同程度の効果がある。

なお、これらの干渉は $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ 炎（高温バーナー）を使用する場合には著しく軽減され、ほとんど問題にならない。

9.3 マグネシウム

試薬の調製

干渉抑制剤液 「9.1 カリウム」と同様のものを用いる。

マグネシウム標準液（市販のマグネシウム標準液（1000mg/L）を使用しても良い）マグネシウム〔Mg〕1gを正確に量って1,000mLのメスフラスコに入れ、塩酸10mLを加えて溶かし、更に標線まで水を加えてマグネシウム標準原液を調製する（この液1mLは、マグネシウムとして1mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を塩酸（1+100）及び最終液量の1/10容量の干渉抑制剤液で正確に希釈し、1mL中に0.1 μg 、0.5 μg 、1 μg 、2 μg 及び5 μg を含有する各マグネシウム標準液を調製する。

試料溶液の調製

「9.1 カリウム（試料溶液の調製）」と同様。

分析操作

試料溶液の一定量（マグネシウムとして0.01～0.5mg相当量）を100mLのメスフラスコに正確に入れ、干渉抑制剤液 10mLを加え、更に標線まで塩酸（1+100）を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレイム中で波長285.2nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各マグネシウム標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のマグネシウム量を算出する。

注 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

注 マグネシウムはリンの体内移動と同化に関するミネラルであり、家畜の成長、繁殖に関連がある。欠乏すると血清中のマグネシウム含量が低下し、興奮し易くなりけいれん症状を起こす。

9.4 ナトリウム

試薬の調製

ナトリウム標準液（市販のナトリウム標準液（1000mg/L）を用いても良い） 塩化ナトリウム（標準試薬）（白金るつぼ中で500～600℃で40～50分間加熱したもの）2.542 gを量って1,000mLのメスフラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてナトリウム標準原液を調製し、ポリエチレン瓶に保存する（この液1 mLは、ナトリウム〔Na〕として1 mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL中に2 μ g, 4 μ g, 6 μ g, 8 μ g及び10 μ gを含有する各ナトリウム標準液を調製する。

※ 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

試料溶液の調製

分析試料2～10 gを正確に量って白金皿に入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、500℃以下で加熱して灰化する。

灰化物に少量の水を加え、100mLのトールビーカーに入れ、塩酸10mLを除々に加え、数分間煮沸した後放冷し、水で250mLのメスフラスコに移し、標線まで水を加え、ろ紙（6種）でろ過し、試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

分析操作

試料溶液の一定量（ナトリウムとして1 mg以下）を100mLのメスフラスコに正確に入れ、標線まで水を加え、原子吸光光度計によりアセチレン—空気フレーム中で波長589.0nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各ナトリウム標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のナトリウム量を算出する。

一般の配合飼料には食塩を添加したり、ナトリウムを含む添加物が使用されているのでナトリウムの含量はかなり高いが、飼料原料によっては、微量のものもある。特に微量のナトリウムを定量する場合は他からの汚染又は混入に注意しなければならない。試料溶液調製の際、使用する磁製又はガラス製器具及び標準液を保存する容器からナトリウムが溶出することもあるので、あらかじめ塩酸（1＋1）で洗浄したポリエチレン製容器を使用することが望ましい。また必要があれば使用するガラス器具等は希塩酸及び水で洗い、更に空試験を行うことが望ましい。

9.5 り ん

1) 第一法

試薬の調製

りん標準液 デシケーター中で24時間以上乾燥したりん酸2水素アンモニウム18.567 g 又はりん酸2水素カリウム21.968 g を量って1,000mLのメスフラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてりん標準原液を調製する（この液1 mLは、りん〔P〕として5 mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を水で正確に希釈し、10mL中に0.5mg, 1 mg, 1.5mg, 2 mg, 2.5mg, 3 mg, 3.5mg及び4 mgを含有する各りん標準液を調製する。

モリブデン酸アンモニウム溶液 モリブデン酸アンモニウム35.3 g を適量の水に溶かす。

発色試液 バナジン酸アンモニウム1.12 g を適量の水に溶かし、硝酸250mLを加えた後、モリブデン酸アンモニウム溶液を加え、更に水を加えて1 Lとし、褐色瓶に保存する。

試料溶液の調製

「9.2 カルシウム（試料溶液の調製）」と同様。

分析操作

試料溶液の一定量（りんとして0.5～4 mg相当量）を100mLのメスフラスコに正確に入れ、フェノールフタレイン試液1滴を加え、アンモニア水（1＋3）を加えて中和し、硝酸（1＋6）で微酸性とする。適量の水で希釈し、発色試液20mLを加え、標線まで水を加え、30分間放置した後、波長400～420nm付近の吸光度を次の示差法により測定する。

採取した試料溶液中のりん量より少ないりん量のりん標準液10mL及び採取した試料溶液中のりん量より多いりん量のりん標準液10mLをそれぞれ100mLのメスフラスコに正確に入れ、適量の水で希釈し、試料溶液の場合と同様に発色させて第一標準液及び第二標準液とし、第一標準液を対照液として第二標準液及び試料溶液の吸光度を測定し、試料中のりん量を算出する。

2) 第二法（簡易法）

試薬の調製

りん標準液　デシケーター中で24時間以上乾燥したりん酸2水素カリウム4.393 gを量って1,000mLのメスフラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてりん標準原液を調製する（この液1 mLは、りん〔P〕として5 mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を水で正確に希釈し、10mL中に0.5mgを含有するりん標準液を調製する。
モリブデン酸アンモニウム溶液　モリブデン酸アンモニウム27 gを水に溶かして1,000mLとする。

バナジン酸アンモニウム溶液　バナジン酸アンモニウム1.17 gを適量の水に溶かし、過塩素酸20mLを加え冷却後、更に水を加えて1,000mLとし、褐色瓶に保存する。

試料溶液の調製

「9.2 カルシウム（試料溶液の調製）」と同様。

分析操作

試料溶液の一定量（りんとして0.5～4 mg相当量）を100mLのメスフラスコに正確に入れ、フェノールフタレイン試液1滴を加え、アンモニア水（1＋3）を加えて中和し、過塩素酸2 mLで微酸性とする。次に、バナジン酸アンモニウム溶液5 mL及びモリブデン酸アンモニウム溶液10mLを加え、標線まで水を加え、30分間放置した後、波長400～420nm付近の吸光度を標準液の吸光度と比較して、試料中のりん量を算出する。

りんはカルシウムとともに骨の主成分である。りんの給源として最も一般的なものは、りん酸三石灰、りん酸二石灰及び骨粉等である。

本法（バナドモリブデン酸アンモニウム法）は酸性溶液中でオルトりん酸が、モリブデン酸塩及びメタバナジン酸塩と反応して錯塩〔(NH₄)₃P O₄・NH₄V O₃・16Mo O₃〕を形成し、安定な黄色を呈する。この黄色液の吸光度を分光光度計で測定しPの量を求める方法である。

また、飼料原料の主体は植物性物質であるが、その中に含まれるりんについては、そのほとんどがフィチンの形で存在し、単胃動物では未消化のまま排泄され利用されていない。

全りん含量からフィチンの形で存在しているリン（フィチンリン）含量を差し引いて求めたものが非フィチンリンである。フィチンリン含量は鉄沈澱法によって求める。この方法は試料中のフィチンリンをトリクロル酢酸あるいは塩酸で抽出したのち鉄塩を加えてフィチン酸鉄の沈澱を生成させ、この沈澱中の全りん量を測定するか、または沈澱中の鉄含量を求めてりん含量を間接的に計算で求めるものである。また、フィチン酸鉄の沈澱をアルカリに溶解し、この溶液を等速電気泳動で分析しフィチンリンを定量することもできる。

ピロりん酸などの非オルトりん酸を含有するおそれのあるときは、硝酸（1＋1）2 mLを加えて煮沸しオルトりん酸に変化させた後、フェノールフタレイン試液を加える操作に移行する。

りんは試料を灰化する際の加熱により非オルトりん酸の形態に変化する場合がある。非オルトりん酸の形態のものは発色剤として定量的に反応しないため、試料溶液に硝酸を加えて煮沸し、非オルトりん酸の形態のものをあらかじめ酸化してオルトりん酸の形態に変化させておかなければならない。

9.6 亜鉛

試薬の調製

亜鉛標準液（市販の亜鉛標準液（1000mg/L）を使用しても良い）

亜鉛（標準試薬）（塩酸（1+3）、水及びアセトンで順次洗浄したもの）1 g を正確に量って1,000mLのメスフラスコに入れ、塩酸10mLを加えて溶かし、更に標線まで水を加えて亜鉛標準原液を調製する（この液1 mLは、亜鉛〔Zn〕として1 mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を塩酸（1+100）で正確に希釈し、1 mL中に0.5 μ g、1 μ g、2 μ g、3 μ g、4 μ g及び5 μ gを含有する各亜鉛標準液を調製する。

試料溶液の調製

分析試料1～10 g を正確に量って100mLの硬質トールビーカー に入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、500℃以下で加熱して灰化する。灰化物に少量の水及び塩酸10mLを徐々に加え、更に水を加えて30mLとし、数分間煮沸した後放冷する。水で100mLのメスフラスコに移し、標線まで水を加えた後、ろ紙（6種）でろ過し、試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

分析操作

試料溶液の一定量（亜鉛として0.05～0.5mg相当量）を100mLのメスフラスコに正確に入れ、標線まで塩酸（1+100）を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長213.9nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

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

注 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

- ① 亜鉛は結晶インシュリン及び炭酸アンヒドラーゼの構成成分として重要なミネラルであり、不足すると成長障害、不全角化症の原因となる。しかしながら、過剰に混入すると有害である。

分析試料を乾式灰化後湿式分解し、約0.1mol/lの塩酸試料溶液とし、波長213.9nmで原子吸光測定を行い、亜鉛標準液による検量線から亜鉛の濃度を求める方法である。

原子吸光測定においては亜鉛は共存元素の干渉を受けることなく、また測定ノイズも少ない元素であるため正確さ及び精度も満足できる分析方法である。

9.7 鉄

試薬の調製

鉄標準液（市販の鉄標準液（1000mg/L）を使用しても良い）

鉄〔Fe〕1gを正確に量ってトールビーカーに入れ、塩酸20mL及び水50mLを加えて煮沸し、放冷後、水で1,000mLのメスフラスコに移し、更に標線まで水を加えて鉄標準原液を調製する（この液1mLは、鉄として1mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を塩酸（1+100）で正確に希釈し、1mL中に0.5 μ g、1 μ g、2 μ g、4 μ g、6 μ g、8 μ g及び10 μ gを含有する各鉄標準液を調製する。

試料溶液の調製

「9.6 亜鉛（試料溶液の調製）」と同様。

分析操作

試料溶液の一定量（鉄として0.05～1.0mg相当量）を100mLのメスフラスコに正確に入れ、標線まで塩酸（1+100）を加え、原子吸光度計によりアセチレン－空気フラーム中で波長248.3nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

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

注 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

注 鉄は家畜の体内で酸素と炭酸ガスの運搬に重要な役割を行い、また、血液中のヘモグロビン等の造成に必要なミネラルである。幼畜では栄養性貧血を起こし易い。

9.8 銅

試薬の調製

銅標準液（市販の銅標準液（1000mg/L）を使用しても良い）

銅（標準試薬）（酢酸（1+49）、水及びエタノールで順次洗浄したもの）1 gを正確に量ってトルビーカーに入れ、硝酸5 mLを加えて溶かし、塩酸5 mLを加えて水浴上で加熱し、蒸発乾固する。塩酸（1+1）10 mLを加えて溶かし、水で1,000 mLのメスフラスコに移し、更に標線まで水を加えて銅標準原液を調製する（この液1 mLは、銅〔Cu〕として1 mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を塩酸（1+100）で正確に希釈し、1 mL中に0.5 µg、1 µg、2 µg、3 µg、4 µg及び5 µgを含有する各銅標準液を調製する。

試料溶液の調製

「9.6 亜鉛（試料溶液の調製）」と同様。

9.8.1 原子吸光光度法

分析操作

試料溶液の一定量（銅として0.05～0.5 mg相当量）を100 mLのメスフラスコに正確に入れ、標線まで塩酸（1+100）を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長324.8 nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

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

* 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

銅は、鉄、コバルトとともに血液中のヘモグロビンの造成に必要で、特に哺乳期子豚には重要なミネラルである。

9.8.2 溶媒抽出-原子吸光光度法

分析操作

試料溶液の一定量（銅として50 µg以下、液量30 mL以下）をあらかじめりん酸14 mLを入れた100 mLの分液漏斗に正確に入れ、よう化カリウム溶液（68 w/v%）5 mLを加え、更に水を加えて50 mLとし、振り混ぜる。5分間放置した後、4-メチル-2-ペンタノン 10 mLを先の分液漏斗に正確に加え、激しく振り混ぜ、静置した後、4-メチル-2-ペンタノン層（上層）について、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長324.8 nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

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

注 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

9.9 マンガン

試薬の調製

マンガン標準液（市販のマンガン標準液（1000mg/L）を使用しても良い）

過マンガン酸カリウム2.877 gを量って1,000mLのメスフラスコに入れ、水100mLを加えて溶かし、硫酸（1+1）1mLを加え、更に亜硫酸水又は過酸化水素水（3 v/v%）を過マンガン酸の色が消えるまで加えて煮沸する。放冷後、標線まで水を加えてマンガン標準原液を調製する（この液1 mLは、マンガン[Mn]として1 mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を塩酸（1+100）で正確に希釈し、1 mL中に0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 5 μ g及び10 μ gを含有する各マンガン標準液を調製する。

試料溶液の調製

「9.6 亜鉛（試料溶液の調製）」と同様。

分析操作

試料溶液の一定量（マンガンとして0.05～1.0mg相当量）を100mLのメスフラスコに正確に入れ、標線まで塩酸（1+100）を加え、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長279.5nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

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

注 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

※ マンガンは骨の形成及びヘモグロビンの合成に関するミネラルである。また、家畜の成長や繁殖にも重要なミネラルである。欠乏すると発育不良、繁殖障害、鶏では産卵やふ化率の低下の原因となり、また、ひなの脚弱症の原因の一つともなっている。

9.10 セレン

試薬の調製

セレン標準液（市販のセレン標準液（1000mg/L）を使用しても良い） セレン[Se] 0.5 gを正確に量ってトールビーカーに入れ、硝酸10mLを加え、水浴上で加熱して溶かし、更に過塩素酸2 mLを加え、加熱して約2 mLになるまで濃縮し、更に塩酸5 mLを加えて5分間加熱する。放冷後、水で500mLのメスフラスコに移し、標線まで水を加えてセレン標準原液を調製する（この液1 mLは、セレンとして1 mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を塩酸（1+100）で正確に希釈し、1 mL中に0.02 μ g, 0.04 μ g, 0.06 μ g, 0.08 μ g及び0.1 μ gを含有する各セレン標準液を調製する。

ジアミノナフタレン液 2,3-ジアミノナフタレン（シグマアルドリッチジャパン社）0.10 gを200mLのトールビーカーに入れ、塩酸（1+100）100mLを加え、50℃の水浴中で加温しながら溶かす。放冷後、この液を分液漏斗Aに入れ、シクロヘキサン40mLを加えて振り混ぜる。水層（下層）を分液漏斗Bに入れ、シクロヘキサン40mLを加えて振り混ぜ、水層をろ紙（2種）でろ過する（使用時に遮光して調製する。）。

EDTA溶液 エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物18.6 gを水に溶かして500mLとする。

試料溶液の調製

分析試料 2 g を正確に量って200mLのトールビーカーに入れ、硝酸20mL及び過塩素酸 5 mLを加え、時計皿で覆い、一夜放置する。

次に、砂浴上で穏やかに加熱し、あわが生じなくなってから強熱し、乾固直前まで濃縮する。放冷後、塩酸 5 mLを加え、砂浴上で5 分間加熱して還元する。放冷後、水で100mLのメスフラスコに移し、標線まで水を加えて試料溶液とする。同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

分析操作

試料溶液の一定量（セレンとして0.2～1 μ g相当量）を100mLのトールビーカーに正確に入れ、EDTA 溶液 5 mLを加え、pHを塩酸（1＋4）で1.0～1.5に調製した後、塩酸（1＋100）で100mLのメスフラスコに移し、更に標線まで同液を加え、ろ紙（2種）でろ過する。

ろ液50mLを100mLのトールビーカーに正確に入れ、ジアミノナフタレン液 5 mLを加えて振り混ぜ、50℃の水浴中で20分間加温する。放冷後、塩酸（1＋100）で100mLの分液漏斗に移し、シクロヘキサン10mLを正確に加え、5 分間振り混ぜる。静置後、水層（下層）を捨て、残留液を塩酸（1＋100）25mLずつで2 回振り混ぜて洗浄した後、シクロヘキサン層（上層）を共栓試験管に移し、適量の硫酸ナトリウム（無水）を加えて脱水した後、分液ろ紙でろ過し、試料溶液とする。

空試験溶液及び各セレン標準液について、同様の操作を行う。

空試験溶液を対照液として試料溶液について励起波長378nm及び蛍光波長520nmで蛍光強度を測定する。

同時に各セレン標準液について、試料溶液と同一条件で蛍光強度を測定し、検量線を作成して試料中のセレン量を算出する。

注 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とし、溶媒は無蛍光試薬又はこれと同等のものをを用いる。

注 家畜に対してセレンは、過剰に与えると中毒を起こす成分として問題視されてきたが、近年では必須無機物として注目されている元素である。

家畜のセレン要求量は0.1～0.3ppm程度で5～10ppm以上では過剰障害を引き起こし過剰と欠乏に対する許容量の幅が極めて小さいのが特色である。

10. 有害金属

10.1 鉛

試薬の調製

鉛標準液（市販の鉛標準液（1000mg/L）を使用しても良い）

鉛〔Pb〕 1 g を正確に量ってトールビーカーに入れ、硝酸10mL及び水30mLを加え、加熱して溶かし、放冷後、水で1,000mLのメスフラスコに移し、更に標線まで水を加えて鉛標準原液を調製する（この液1 mLは、鉛として1 mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL中に0.5 μ g、1 μ g、2 μ g及び3 μ gを含有する各鉛標準液を調製する

試料溶液の調製

「9.6 亜鉛（試料溶液の調製）」と同様。

分析操作

試料溶液の一定量（鉛として30 μ g以下、液量30mL以下）をあらかじめりん酸14mLを入れた100mLの分液漏斗に正確に入れ、よう化カリウム溶液（68w/v%）5 mLを加え、更に水を加えて50mLとし、振り混ぜる。

5 分間放置した後、4-メチル-2-ペンタノン10mLを先の分液漏斗に正確に加え、激しく振り混ぜ、静置した後、4-メチル-2-ペンタノン層（上層）について、原子吸光光度計によりアセチレン-空気フレーム中で波長283.3nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

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

注 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

10.2 カドミウム

試薬の調製

カドミウム標準液（市販のカドミウム標準液（1000mg/L）を使用しても良い） カドミウム〔Cd〕0.1 gを正確に量ってトールビーカーに入れ、硝酸（1＋9）50mLを加え、加熱して溶かし、煮沸して窒素酸化物を除去し、放冷後、水で1,000mLのメスフラスコに移し、更に標線まで水を加えてカドミウム標準原液を調製する（この液1 mLは、カドミウムとして0.1mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を塩酸（1＋100）で正確に希釈し、1 mL中に0.2 μ g、0.4 μ g、0.6 μ g、0.8 μ g及び1 μ gを含有する各カドミウム標準液を調製する。

試料溶液の調製

「9.6 亜鉛（試料溶液の調製）」と同様。

分析操作

試料溶液の一定量（カドミウムとして10 μ g以下、液量30mL以下）をあらかじめりん酸14mLを入れた100mLの分液漏斗に正確に入れ、よう化カリウム溶液（68w/v%）5 mLを加え、更に水を加えて50mLとし、振り混ぜる。

5 分間放置した後、4-メチル-2-ペンタノン 10mLを先の分液漏斗に正確に加え、激しく振り混ぜ、静置した後、4-メチル-2-ペンタノン層（上層）について、原子吸光光度計によりアセチレン－空気フレーム中で波長228.8nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各カドミウム標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のカドミウム量を算出する。

注 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

飼料中のカドミウム含有量は穀類で0～0.5ppm、魚粉では約0.5ppm、酵母では0～3 ppmと比較的に少ないため、0.1mol/L塩酸試料溶液の直接原子吸光測定は難しいが、M I B K抽出液の場合には感度もよく、また安定した状態で測定できる。なお、フレームレス原子吸光装置を用いれば、測定感度はフレーム法の100倍以上高くなる。

10.3 クロム

試薬の調製

クロム標準液（市販のクロム標準液（1000mg/L）を使用しても良い） ニクロム酸カリウム（標準試薬）（めのう乳ばちを用いて粉末とし、100～110℃で3～4時間乾燥したもの）0.283 gを量って1,000mLのメスフラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてクロム標準原液を調製する（この液1 mLは、クロム〔Cr〕として0.1mgを含有する。）。使用に際して、標準原液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL中に1 μg, 2 μg, 3 μg, 4 μg及び5 μgを含有する各クロム標準液を調製する。

1,5ジフェニルカルボノヒドラジド液 1,5ジフェニルカルボノヒドラジド0.5 gをアセトンに溶かして100mLとする。
希釈酸 硫酸（1＋6）に過マンガン酸カリウム溶液（0.3w/v%）を滴下して微紅色とする。

試料溶液の調製

分析試料1 gを正確に量って白金るつぽに入れ、穏やかに加熱して炭化させた後、500℃で加熱して灰化する。

灰化が不完全な場合は、放冷後、硫酸（1＋1）0.5～1 mL及び硝酸4～5 mLを加えて砂浴上で加熱して蒸発乾固し、更に硝酸4～5 mLずつを加えて蒸発乾固を数回繰り返す、完全に分解した後、初め低温で後に450～500℃で加熱して灰化する。

放冷後、炭酸ナトリウム5 g及び硝酸ナトリウム0.5 gを混和し、穏やかに加熱した後、600℃で15分間加熱して融解する。

放冷後、内容物に少量の水を加え、不溶解物をガラス棒ですりつぶし、クロムの量に応じ水を加えて正確に100～500mLとした後、遠心沈殿管に入れ、1,000rpmで3分間遠心分離し、上澄み液を試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

分析操作

試料溶液の一定量（クロムとして50μg相当量）を50mLのメスフラスコに正確に入れ、希釈酸を中和量より2 mL過剰に加え、更に1,5ジフェニルカルボノヒドラジド液1 mLを加え、標線まで水を加え、30分間放置した後、同様に操作して調製した空試験溶液を対照液として波長540nm付近の吸光度を測定する。

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

10.4 水 銀

試薬の調製

水銀標準液（市販の水銀標準液（100mg/L）を使用しても良い） 塩化水銀（Ⅱ）0.339 g を量って500mLのメスフラスコに入れ、硝酸（1＋1）5 mLを加えて溶かし、更に標線まで水を加えて水銀標準原液を調製する（この液1 mLは、水銀〔Hg〕として0.5mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を硝酸（1＋70）で正確に希釈し、1 mL中に2 ng, 4 ng, 6 ng, 8 ng及び10 ngを含有する各水銀標準液を調製する。

塩化すず液 塩化すず（Ⅱ）二水和物10 gに硫酸（1＋20）60mLを加え、かき混ぜながら加熱して溶かし、放冷後、水を加えて100mLとする。

試料溶液の調製

分析試料1 gを正確に量って100mLのメスフラスコに入れ、五酸化バナジウム20mgを加え、更に硝酸10mLを加えて試料を十分に潤した後、一夜放置する。

次に、200℃以下の砂浴上で5分間加熱し、放冷後、過塩素酸10mLを加えて1時間加熱し、放冷後、標線まで水を加えて試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

各水銀標準液について、同様の操作を行う。

分析操作

試料溶液20mLを回転子を入れた還元容器（100mL程度の三角フラスコ）に正確に入れ、塩化すず液2 mLを加えて直ちに装置に連結し、2分間激しくかき混ぜた後、空気ポンプを作動させて通気し、発生した水銀蒸気を吸収セル（石英ガラス製 内径30mm、長さ100～300mm）に導き、波長253.7nmの吸光度を測定する。

空試験溶液20mLについて、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

同時に、各水銀標準液各20mLについて、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中の水銀量を算出する。

注 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

10.5 ひ 素

試薬の調製

ひ素標準液（市販のひ素標準液（100mg/L）を使用しても良い）

三酸化二ひ素（標準試薬）（105℃で3～4時間乾燥したもの）1.320 gを量ってビーカーに入れ、水酸化ナトリウム溶液（4 w/v%）5 mL及び水50 mLを加え、加熱して溶かす。放冷後、フェノールフタレイン試液1滴を加え、硫酸（1+10）で中和し、水で1,000 mLのメスフラスコに移し、更に標線まで水を加えてひ素標準原液を調製する（この液1 mLは、ひ素〔As〕として1 mgを含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL中に0.02 μg, 0.04 μg, 0.06 μg, 0.08 μg及び0.1 μgを含有する各ひ素標準液を調製する。

塩化すず液 塩化すず（Ⅱ）二水和物20 gを塩酸（ひ素分析用）に溶かして100 mLとする（使用時に調製する。）。希釈酸 水600 mLに硫酸70 mL及び塩酸（ひ素分析用）250 mLを加え、更に水を加えて1 Lとする。

亜鉛粉末 亜鉛粉末（ひ素分析用）又は錠剤（亜鉛粉末（ひ素分析用）に適量の水を加えてペースト状とし、錠剤成型器に塗り込み、80℃で20分間乾燥して成型したもの。)

試料溶液の調製

分析試料2 gを正確に量って100 mLのトルビーカーに入れ、硝酸10 mL及び硫酸1 mLを加え、時計皿で覆い、一夜放置する。次に、砂浴上で穏やかに30分間加熱し、あわが生じなくなったら強熱し、放冷後、過塩素酸10 mLを加え、再び時計皿で覆い、砂浴上で3時間加熱して5 mL以下になるまで濃縮し、塩酸（1+10）5 mL及び水20 mLを加え、加温して溶かす。放冷後、水で100 mLのメスフラスコに移し、標線まで水を加え、ろ紙（6種）でろ過し、試料溶液とする。

同時に、試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製する。

分析操作

試料溶液 10 mLを水素化ひ素発生装置の反応容器に正確に入れ、希釈酸15 mL及びよう化カリウム溶液（20 w/v%）1 mLを加え、数分間放置した後、塩化すず液0.5 mLを加えて振り混ぜ、15分間放置する。

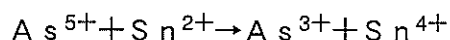
次に、水素化ひ素発生装置と原子吸光光度計を連結し、系内の空気をアルゴンで置換した後、亜鉛粉末1 g（又は錠剤1個）を加え、かき混ぜ機を作動し、発生した水素化ひ素をアルゴン-水素フレイム中に導き、波長193.7 nmの吸光度を測定する。

空試験溶液について、同様に吸光度を測定し、結果を補正する。

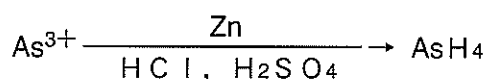
同時に、各ひ素標準液について、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定し、検量線を作成して試料中のひ素量を算出する。

注 使用する酸は、原子吸光分析用試薬とする。

① 試料を硝酸と過塩素酸で分解し、調製したひ素を含んだ試料溶液（As³⁺、As⁵⁺）に希釈酸（塩酸、硫酸混液）を加えた後、塩化すず液を加えて還元しAs³⁺とする。



還元反応が終了後（通常10～15分位）亜鉛錠剤を加え、発生器の水素を作用させる。



11 蛋白質の分画

11.1 可溶性蛋白質（CPs, SIP）

ルーメン内で速やかに吸収される蛋白質

試薬の調製

リン酸2水素ナトリウム溶液 リン酸2水素ナトリウム（2水）13.8 gを計り、水に溶かして1Lとする。

4ホウ酸ナトリウム溶液 4ホウ酸ナトリウム（10水）8.9 gを計り、水に溶かして1Lとする。

緩衝液 リン酸2水素ナトリウム溶液100mLと4ホウ酸ナトリウム溶液100mLを合わせて、pH6.8に調製する。

分析操作

分析試料0.5 gを正確に量って50mLのポリサンプルビンに入れ、緩衝液でビンを満たす。ビンに栓とゴムバンドを施し、振とう培養器中で40℃で1時間分解を行う。内容物をろ紙（5種A）を用いてろ過し、水で十分洗浄し、更に少量のアセトンで3～4回洗浄した後、風乾する。

次に残さをろ紙ごとケルダールスラスコに入れ、以下「4.2 粗蛋白質 定量」に従い、残さ中の粗蛋白質量を算出する。

【計 算】

$$[\text{可溶性蛋白質}] = [\text{粗蛋白質}] - [\text{残さ中の粗蛋白質}]$$

11.2 分解性蛋白質（CPd, DIP）

ルーメン内で、直ぐには吸収されないが、徐々に吸収される蛋白質

試薬の調製

リン酸2水素ナトリウム溶液 リン酸2水素ナトリウム8.6 gを計り、水に溶かして1Lとする。

4ホウ酸ナトリウム溶液 4ホウ酸ナトリウム（10水）13.2 gを計り、水に溶かして1Lとする。

緩衝液 リン酸2水素ナトリウム溶液500mLと4ホウ酸ナトリウム溶液500mLを合わせて、pH7.8～8.0に調製する。

酵素溶液 アクチナーゼ（科研製薬製）60mgを緩衝液1Lに溶かす。

分析操作

分析試料0.5 gを正確に量って50mLのポリサンプルビンに入れ、緩衝液40mLを加え、恒温槽に入れ40℃で1時間静置する。次に、恒温槽からビンを取り出し、酵素溶液10mLを加え、ビンに栓とゴムバンドを施し、振とう培養器中で40℃で48時間（配合飼料は18時間）蛋白質の分解を行う。内容物をろ紙（5種A）を用いてろ過し、水で十分洗浄し、更に少量のアセトンで3～4回洗浄した後、風乾する。

次に残さをろ紙ごとケルダールスラスコに入れ、以下「4.2 粗蛋白質 定量」に従い、残さ中の粗蛋白質量を算出する。

【計 算】

$$[\text{分解性蛋白質}] = [\text{粗蛋白質}] - [\text{残さ中の粗蛋白質}]$$

11.3 結合性蛋白質（CPb, BP）

吸収されないで排出される蛋白質

結合性蛋白質は、酸性デタージェント繊維残さ中の粗蛋白質として表す。

分析操作

分析試料により「5.1 酸性デタージェント繊維（ADF）」の「水で十分洗浄し、更に少量のアセトンで3～4回洗浄した後、風乾する。」までの操作を行う。

次に残さをろ紙ごとケルダールスラスコに入れ、以下「4.2 粗蛋白質 定量」に従い、残さ中の粗蛋白質量を算出する。

11.4 非分解性蛋白質（CPu, UIP）

ルーメンで吸収されない蛋白質

分解性蛋白質（CPd, DIP）を「11.2」により求め、

非分解性蛋白質（CPu, UIP）＝粗蛋白質（CP）－分解性蛋白質（CPd, DIP）

により算出しても求められる。

試薬の調製

リン酸2水素ナトリウム溶液 リン酸2水素ナトリウム（2水）13.8 gを計り、水に溶かして1Lとする。

4ホウ酸ナトリウム溶液 4ホウ酸ナトリウム（10水）8.9 gを計り、水に溶かして1Lとする。

緩衝液 リン酸2水素ナトリウム溶液100mLと4ホウ酸ナトリウム溶液100mLを合わせて、pH6.8に調製する。

酵素溶液 アクチナーゼ（科研製薬製）60mgを緩衝液1Lに溶かす。

分析操作

分析試料2.0 gを正確に量って50mLのポリサンプルビンに入れ、緩衝液40mLを加え、恒温槽に入れ40℃で1時間分解を行う。次に、恒温槽からビンを取り出し、酵素溶液10mLを加え、ビンに栓とゴムバンドを施し、振とう培養器中で40℃で48時間蛋白質の分解を行う。内容物をろ紙（5種A）を用いてろ過し、水で十分洗浄し、更に少量のアセトンで3～4回洗浄した後、風乾する。

次に残さをろ紙ごとケルダールスラスコに入れ、以下「4.2 粗蛋白質定量」に従い、残さ中の粗蛋白質量を算出する。

この分析に従った蛋白質の分画を図7示す。

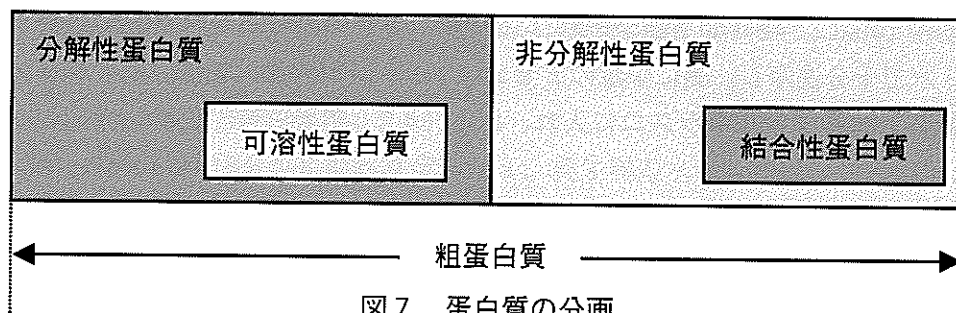


図7 蛋白質の分画

12 ビタミン類

12.1 β -カロチン

カロチンとは？

カロチンは、カロチノイド系の色素で、動植物界に広く分布している黄色、橙色又は紅色の色素である。化学的性質は、光、熱、酸素、酸及びアルカリに不安定で変成しやすい。 α 、 β 、 γ の3種類の異性体があり、 β -カロチンが大半をしめている。動物がカロチンを摂取した場合、カロチンは腸及び小腸でビタミンAに変化するので、プロビタミンAと呼ばれることもある。

なお、ビタミンAには、初めからビタミンAの型になっているもの（動物性の食品にだけ含まれる）と、体内で必要に応じてビタミンAに変わるカロチン（植物性、動物性食品の両方に含まれる）とがある。

【プロビタミンA】 動物体内で、ビタミンAに変わる物質。カロチンを初め幾つか存在が確認されている。

試薬の調製

ピロガロール試液 ピロガロールをエタノールで希釈して10%ピロガロールを調製する。

水酸化カリウム溶液 水酸化カリウム40 gを、メタノールに溶かして100mLとする。

硫酸ナトリウム溶液 無水硫酸ナトリウム10 gを水に溶かして100mLとする。

ベータカロチン標準液 ベータカロチン10mgを正確に計って、50mLの褐色メスフラスコに入れ、n-ヘキサンを加えて溶かし、更に標線までn-ヘキサンを加えてベータカロチン標準原液を調製する（この液1 mLは、ベータカロチンとして0.2mgを含有する。）。次に、この原液の453nmの吸光度を測定し、原液濃度を校正する（ベータカロチン $E_{1cm}^{1\%} = 2592$ ）。

使用に際して、この原液の一定量をn-ヘキサンで正確に希釈し、1mL中に20 μ gを含有する標準液を調製する。

注 標準液、試料溶液及び溶離液に使用する溶媒は、HPLC用試薬とする（水の場合は、アドバンテックCPW-101超純水器（導電率2MW $\cdot$ cm）で調製したものでも良い）。

分析操作

1) 乾 草

抽 出 分析試料2 gを正確に量って100mLの褐色共栓三角フラスコに入れ、n-ヘキサン 30mLを加え、1分間振り混ぜて抽出した後、ピロガロール試液1mLを加え更に1分間振り混ぜて、窒素ガスでフラスコ内を満たし1夜暗所に静置する。次に、n-ヘキサン30mLを加え1分間振り混ぜた後、硫酸ナトリウム溶液を加えて100mLとし、1分間振り混ぜて1時間暗所に静置する。上層（n-ヘキサン）を分収して、適量の無水硫酸ナトリウムで脱水し、40℃以下の温度で、窒素ガスを吹き込みながら濃縮乾固する。クロロホルム 5 mLを正確に加えて残留物を溶かし、高速液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

2) 生 草

抽 出 分析試料2 gを正確に量って100mLの褐色共栓三角フラスコに入れ、石油エーテル-アセトン（70+30）30mLを加え、窒素ガスでフラスコ内を満たし1夜暗所に静置する。次に、水酸化カリウム溶液 2 mLを加えて30分間静置し、更に水 2 mL加えて1分間振り混ぜ30分間静置し、n-ヘキサン70mLを加えて1分間振り混ぜた後、上層（n-ヘキサン）を分収して、適量の無水硫酸ナトリウムで脱水し、その一定量（25mL程度）を40℃以下の温度で、窒素ガスを吹き込みながら濃縮乾固する。クロロホルム 5 mLを正確に

加えて残留物を溶かし、高速液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

3) サイレージ

抽出 分析試料 2 g を正確に量って100mLの褐色共栓三角フラスコに入れ、石油エーテル—アセトン（70+30）30mL及び水酸化カリウム溶液 2 mLを加え、70℃で30分間醗化する。冷却後、水 2 mLを加え30分間静置する。n-ヘキサン70mLを加えて1分間振り混ぜた後、上層（n-ヘキサン）を分収して、適量の無水硫酸ナトリウムで脱水し、その一定量（25mL程度）を40℃以下の温度で、窒素ガスを吹き込みながら濃縮乾固する。クロロホルム 5 mLを正確に加えて残留物を溶かし、高速液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

高速液体クロマトグラフィー 試料溶液及び混合素標準液各20 μ Lを高速液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検出器：紫外吸光光度検出器（測定波長：453nm）

カラム： μ Bondapak C-18（内径3.9mm，長さ300mm，粒径10 μ m）又はこれと同等のもの

溶離液：アセトニトリル—メタノール—クロロホルム（47+47+6）

流速：2.0 mL/min

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のベータカロチンを算出する。

1)～3)の試料溶液を用いて、453nmの吸光度を測定することにより総カロチン量を算出することもできる。

12.2 ビタミンE

ビタミンEとは、

脂溶性のビタミンで、肝臓、脂肪組織、心臓、筋肉、睪丸、子宮、血液、副腎、下垂体に蓄えられている。ビタミンEは、「トコフェロール」と呼ばれる化合物の集まりで、 α 、 β 、 γ 、 δ （デルタ）、 ϵ （エプシロン）、 ζ （ゼータ）、 η （エタ、）及び θ （セター）-トコフェロールの8種類があり、その中の α -トコフェロールが一番強い効力をもっている。

また、効力は強力な抗酸化物質、脂肪を含んだ化合物の酸化を防ぐと同時に、ビタミンA、セレンウム、2つの含硫アミノ酸（システイン、メチオニン）、ビタミンCの酸化を防止し、更にビタミンAの活性を高める。

試薬の調製

ピロガロール試液 ピロガロールをエタノールで希釈して10%ピロガロールを調製する。

水酸化カリウム溶液 水酸化カリウム60 g を、メタノールに溶かして100mLとする。

酢酸dl- α -トコフェロール標準液 酢酸dl- α -トコフェロール1 g を正確に量って100mLの褐色メスフラスコに入れ、エタノールを加えて溶かし、更に標線までエタノールを加えて酢酸dl- α -トコフェロール標準原液を調製する（この液1 mLは、酢酸dl- α -トコフェロールとして10mgを含有する。）。

使用に際して、この原液の一定量をn-ヘキサンで正確に希釈し、1mL中に20 μ gを含有する標準液を調製する。

注 標準液、試料溶液及び溶離液に使用する溶媒は、HPLC用試薬とする（水の場合は、アドバンテックCPW-101超純水器（導電率2MW $\cdot$ cm）で調製したものでも良い。）。

分析操作

抽出 分析試料2 g を正確に量って125mLの褐色遠沈管に入れ、ピロガロール試液20mL、水酸化カリウム溶液5 mLを加え、70℃の水浴中で15分間加熱する。放冷後、水45mL、n-ヘキサン45mLを加え1分間振り混ぜて30分間静置する。分離しない場合は、遠心分離を行う。上層（n-ヘキサン）を分収し、下層（水層）は更にn-ヘキサン45mLを加えてよく振り混ぜ静置後、上層を分収し、先の上層（n-ヘキサン）と合わせて適量の無水硫酸ナトリウムで脱水し、40℃以下の温度で、窒素ガスを吹き込みながら濃縮乾固する。エタノール5 mLを正確に加えて残留物を溶かし、高速液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

高速液体クロマトグラフィー 試料溶液及び混合素標準液各20 μ Lを高速液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検出器：紫外吸光光度検出器（測定波長：280nm）

カラム：Fine pak SIL C-18（内径4.6mm、長さ250mm、粒径10 μ m）又はこれと同等のもの

溶離液：メタノール-水（95+5）

流速：1.5 mL/min

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のビタミンEを算出する

13 近赤外分光法 (NIR)

13.1 近赤外分光法について

近赤外分光光度計による分析方法

- ①予めいくつかの成分値の判っている試料に近赤外線を照射し、その吸収又は反射スペクトルを照射して、各成分と相関を示した波長と試料を基に検量線を作成する。
- ②未知試料に近赤外線を照射し、その吸収又は反射スペクトル強度と予め作成した検量線から未知試料の成分値を推定する。

ここでは、近赤外分光法の理論的な内容は省略し、どの様に分析を行っているのか説明する。理論については、専門書等に詳しく解説されているので、それを参照されたい。

13.2 近赤外分光法のメリット・デメリット

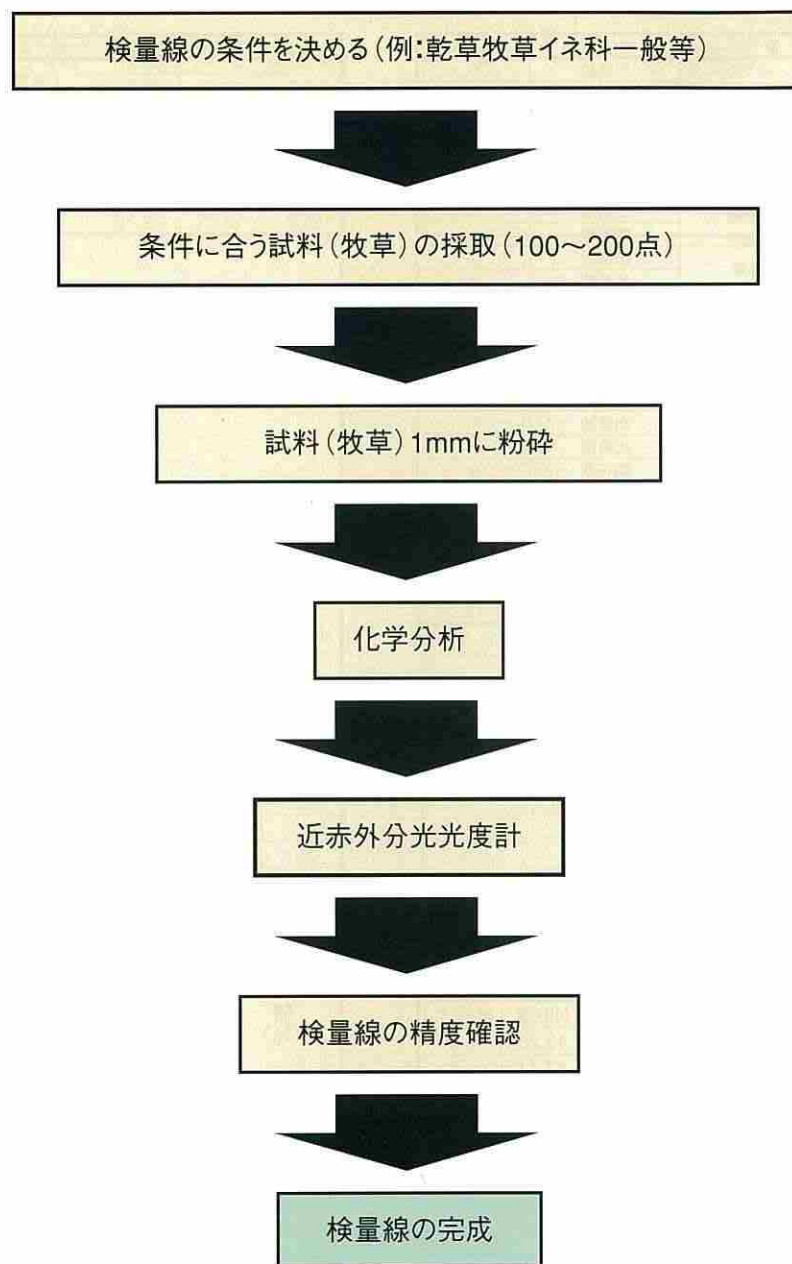
近赤外分光法による分析は、一般に化学分析でかかる労力、時間及びコストの節約になり、中でも時間の節約が飼料分析に関しては大きなメリットになる。

化学分析では一般栄養成分を分析するだけで通常一週間の時間を要するのに、近赤外分光法では、1日で結果を出すことができる。デメリットとしては、化学分析値と近赤外分光での分析値とが若干異なる数値がでることであるが、多量の試料を分析することを考えれば、若干の値の違いよりも、分析時間を短縮できるメリットの方が大きいと考える。

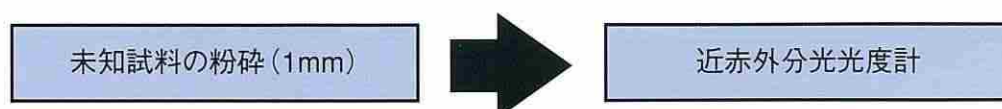
13.3 検量線の作成

牧草は、科、草種、品種、番草、発育ステージ、地域及び調製方法等の諸条件により栄養成分値が異なる。これらの条件すべてを満たす検量線を作成すれば、より短時間で高精度の分析結果を得ることができるが、合理的であるとは言えない。理由は、信頼のおける検量線を作成するには100～200点の試料の化学分析を行う必要があり、現実的に不可能であるからである。そこで、現在、当センターで使用している検量線は、「乾草イネ科一般」と「サイレージイネ科一般」としてのものである。その検量線を各成分毎に表したのが13.4 検量線データである。現在、「とうもろこしサイレージ」及び「乾草アルファルファ」の検量線を作成中である。

検量線作成のプロセス



検量線が完成したら未知試料の分析を行う。



※ 未知試料の近赤外線吸収と検量線から成分値を出す。

13.4 検量線データ

13.4.1 牧草イネ科一般

検量線作成に使用した牧草

データ数 95 点

草 種	番 草	生育期	点 数
イタリアンライグラス	1 番草	出穂始	1
		出穂期	10
		開花始	2
		開花期	1
	2 番草	結実期	3
		出穂始	1
イタリアンライグラス主体混播	1 番草	出穂期	3
		伸長期	2
	2 番草	出穂期	2
チモシー	1 番草	出穂期	3
		開花期	2
	2 番草	開花期	1
チモシー主体混播	1 番草	出穂始	1
		出穂期	11
		開花期	9
		結実期	8
	2 番草	伸長期	5
		開花期	1
		結実期	1
		出穂前	1
バレンアルアリグラス主体混播	1 番草	出穂前	1
	再生草	出穂前	13

草 種	番 草	生育期	点 数
オーチャードグラス	1 番草	出穂期	2
		開花期	1
	2 番草	伸長期	1
		開花始	1
	3 番草	不明	2
		不明	1
オーチャードグラス主体混播	1 番草	出穂始	4
		出穂期	30
		伸長期	7
		開花始	1
		開花期	3
		結実期	1
		不明	8
	2 番草	出穂期	1
		伸長期	17
		開花始	3
		開花期	1
		結実期	1
		不明	2
		伸長期	10
リードカナリーグラス主体混播	1 番草	出穂始	1
		出穂期	1
		開花期	1
	2 番草	出穂期	1
		伸長期	3
		不明	1
	3 番草	伸長期	1

① 粗蛋白質（CP）

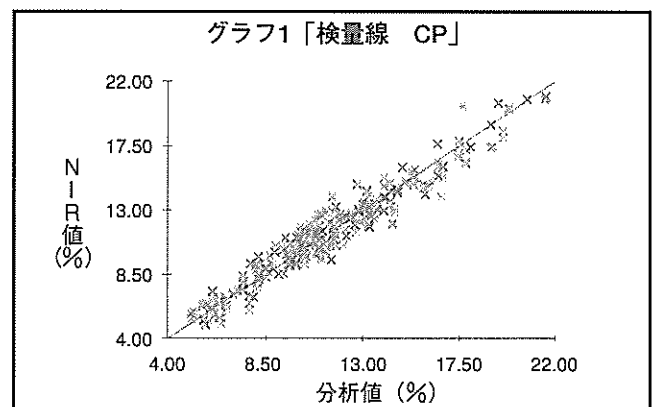
波 長：1770,2162nm

相関係数：0.97

標準誤差：0.92

分析値とNIR値との差

NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
1	イタリアンライグラス	1 番草	出穂期	13.39	13.28	-0.83
2				17.64	17.44	-1.11
3				14.34	13.50	-5.85
4	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	14.60	13.80	-5.50
5				14.39	14.20	-1.30
6				13.60	13.49	-0.78



② 粗脂肪（EE）

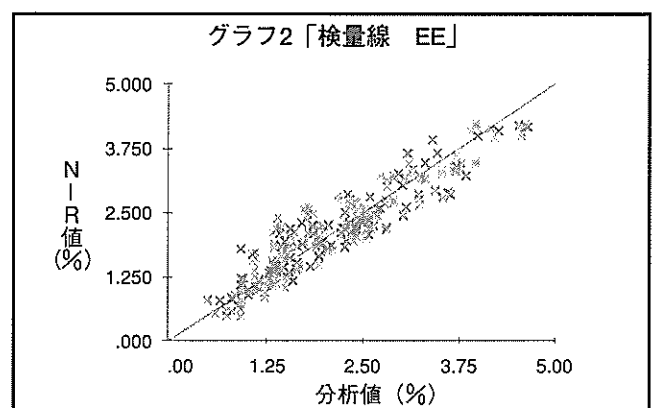
波 長：1768nm 2300nm

相関係数：0.93

標準誤差：0.35

分析値とNIR値との差

NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
1	イタリアンライグラス	1 番草	出穂期	2.66	2.74	2.86
2				3.30	3.17	-3.91
3				3.76	3.79	0.90
4	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	3.82	4.16	8.81
5				3.14	3.24	3.09
6				2.50	2.79	11.66



③ 粗繊維（CF）

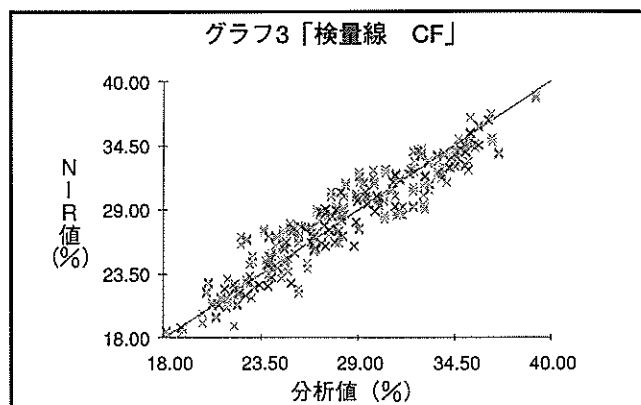
波 長：1748,2342nm

相関係数：0.94

標準誤差：1.52

分析値とNIR値との差

NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
1	イタリアンライグラス	1 番草	出穂期	20.49	19.21	-6.24
2				21.27	19.48	-8.39
3				22.12	22.15	0.12
4	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	24.60	25.40	3.25
5				23.70	24.10	1.67
6				24.26	25.67	5.79



④ 有機細胞壁物質（OCW）

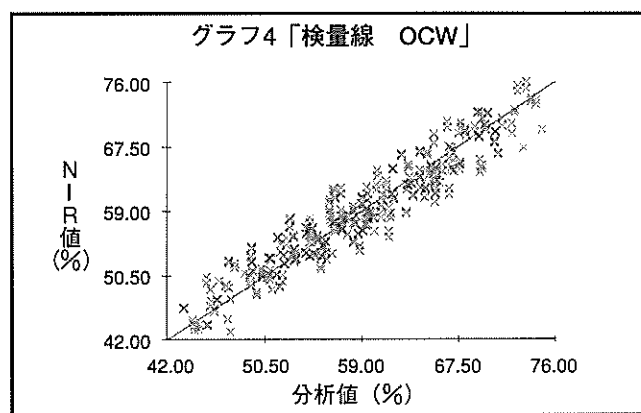
波 長：1754,1972nm

相関係数：0.94

標準誤差：2.38

分析値とNIR値との差

NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
1	イタリアンライグラス	1 番草	出穂期	48.58	47.15	-2.95
2				49.32	48.37	-1.93
3				49.69	50.60	1.83
4	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	56.30	56.65	0.63
5				59.00	55.87	-5.31
6				55.03	57.41	4.33



⑤ 有機細胞壁物質分画（Ob）

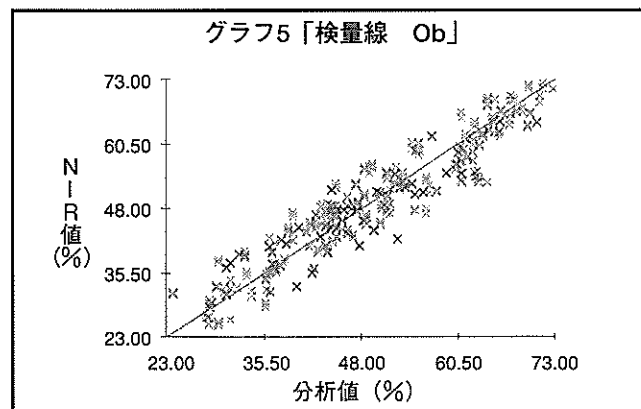
波 長：1670,2322nm

相関係数：0.94

標準誤差：4.05

分析値とNIR値との差

NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
1	イタリアンライグラス	1 番草	出穂期	34.30	33.21	-3.17
2				28.55	31.30	9.61
3				32.78	31.03	-5.33
4	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	37.77	33.30	-11.85
5				40.48	37.62	-7.08
6				44.21	39.36	-10.98



⑥ 酸性デタージェント繊維（ADF）

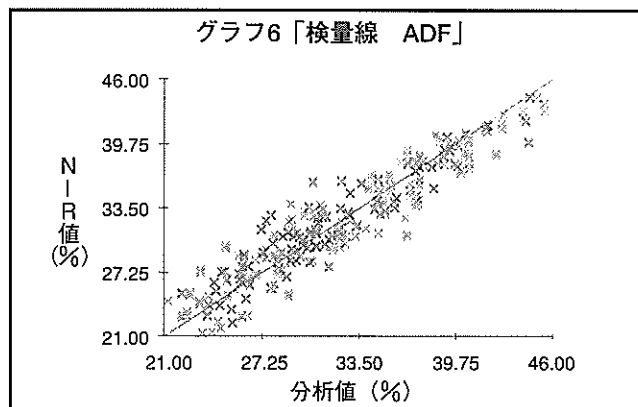
波 長：1670,2224nm

相関係数：0.93

標準誤差：2.03

分析値とNIR値との差

NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
1	イタリアンライグラス	1 番草	出穂期	21.62	23.42	8.33
2				23.21	22.11	-4.73
3				22.63	21.71	-4.05
4	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	25.25	22.77	-9.82
5				24.31	24.40	0.39
6				25.74	25.63	-0.41



⑦ 中性デタージェント繊維（NDF）

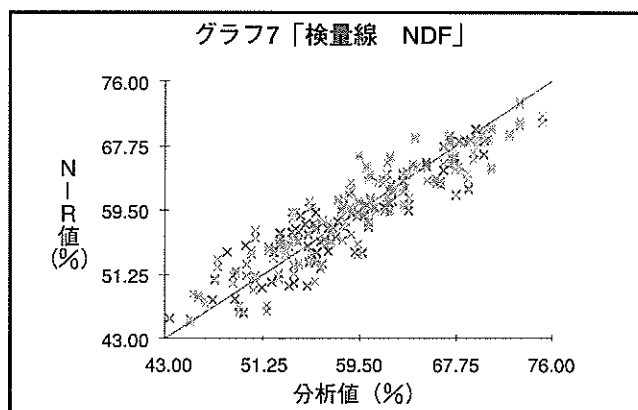
波 長：2048,2290nm

相関係数：0.91

標準誤差：2.71

分析値とNIR値との差

NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
1	イタリアンライグラス	1 番草	出穂期	47.89	47.46	-0.90
2				50.76	50.92	0.32
3				54.41	52.05	-4.34
4	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	59.31	57.18	-3.59
5				56.31	56.85	0.97
6				57.54	58.37	1.44



13.4.2 サイレージイネ科一般

検量線作成に使用した牧草

データ数135点

草種	番草	生育期	点数
イタリアンライグラス主体混播	1 番草	出穂期	1
		伸長期	1
	2 番草	開花期	1
		結実期	3
オーチャードグラス	1 番草	出穂期	5
	2 番草	伸長期	4
オーチャードグラス主体混播	1 番草	出穂始	9
		出穂期	17
		開花始	2
		開花期	9
	2 番草	開花始	4
		出穂期	9
		伸長期	21
		不明	2
		不明	2
チモシー主体混播	1 番草	開花期	11
		出穂期	1
		出穂始	1
	2 番草	出穂期	4
		伸長期	1

草種	番草	生育期	点数
トールフェスク主体混播	1 番草	出穂期	2
		開花期	1
	2 番草	伸長期	1
リードカナリーグラス主体混播	1 番草	出穂期	2
	2 番草	結実期	1
		開花期	4
	3 番草	出穂期	1
		結実期	1
スーダングラス	1 番草	開花始	1
		開花期	1
		不明	1
	2 番草	伸長期	2
不明	不明	不明	11

⑧ 粗蛋白質 (CP)

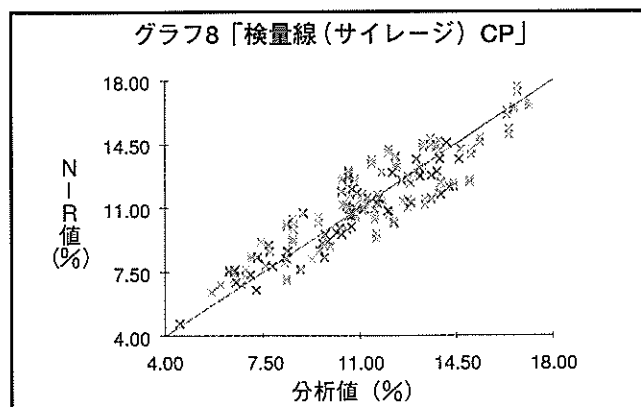
波 長：2174nm

相関係数：0.91

標準誤差：1.16

分析値とNIR値との差

NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
7	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	8.86	9.11	2.82
8	チモシー	1 番草	出穂期	8.85	9.00	1.69
9				12.43	12.36	-0.59
10				9.26	9.11	-1.67
11	リードカナリーグラス	2 番草	出穂期	10.58	11.80	11.53
12		3 番草		9.55	10.99	15.08
13	ローズグラス	1 番草	出穂期	12.89	12.79	-0.81



⑨ 粗脂肪 (EE)

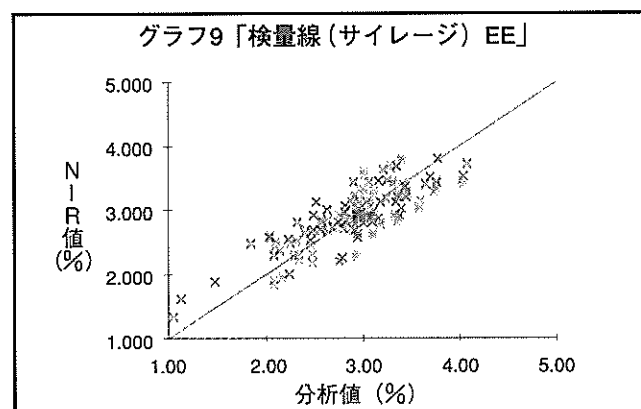
波 長：2310nm

相関係数：0.83

標準誤差：0.31

分析値とNIR値との差

NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
7	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	2.63	2.48	-5.72
8	チモシー	1 番草	出穂期	2.17	2.14	-1.36
9				1.98	2.47	24.85
10				3.33	2.94	-11.59
11	リードカナリーグラス	2 番草	出穂期	1.20	1.45	20.83
12		3 番草		1.85	2.27	22.68
13	ローズグラス	1 番草	出穂期	2.30	2.19	-5.00



⑩ 粗繊維 (CF)

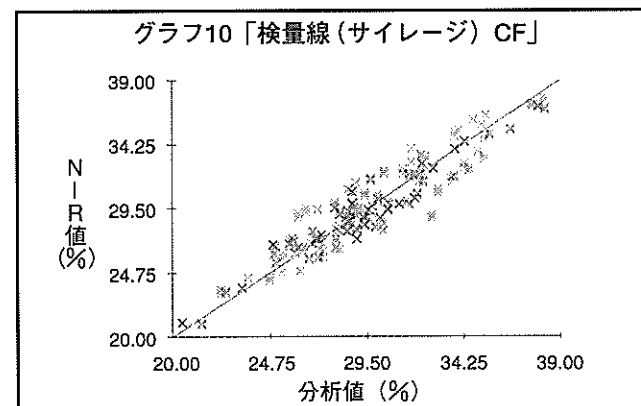
波 長：1968,2288nm

相関係数：0.94

標準誤差：1.24

分析値とNIR値との差

NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
7	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	28.58	29.44	2.99
8	チモシー	1 番草	出穂期	31.85	29.86	-6.23
9				27.03	27.93	3.31
10				31.34	31.62	0.88
11	リードカナリーグラス	2 番草	出穂期	29.50	28.63	-2.93
12		3 番草		26.19	26.58	1.47
13	ローズグラス	1 番草	出穂期	26.54	27.42	3.32



⑪ 有機細胞壁物質（OCW）

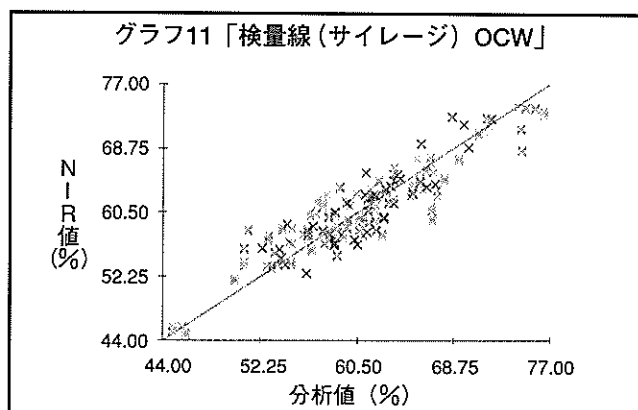
波 長：1756,1266nm

相関係数：0.91

標準誤差：2.63

分析値とNIR値との差

NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
7	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	56.57	55.29	-2.26
8	チモシー	1 番草	出穂期	59.83	58.45	-2.30
9				60.44	59.94	-0.83
10				61.93	61.47	-0.75
11	リードカナリーグラス	2 番草	出穂期	65.71	63.32	-3.64
12		3 番草		59.24	61.46	3.74
13	ローズグラス	1 番草	出穂期	56.80	58.66	3.27



⑫ 有機細胞壁物質分画（Ob）

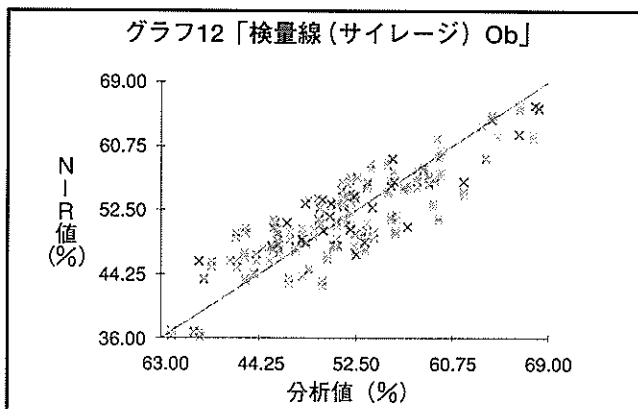
波 長：1756,1554nm

相関係数：0.87

標準誤差：3.45

分析値とNIR値との差

NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
7	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	49.72	51.56	3.69
8	チモシー	1 番草	出穂期	52.54	54.97	4.63
9				54.24	52.60	-3.03
10				54.93	54.99	0.10
11	リードカナリーグラス	2 番草	出穂期	57.99	54.43	-6.15
12		3 番草		55.97	52.36	-6.46
13	ローズグラス	1 番草	出穂期	49.78	53.15	6.76



⑬ 酸性デタージェント繊維（ADF）

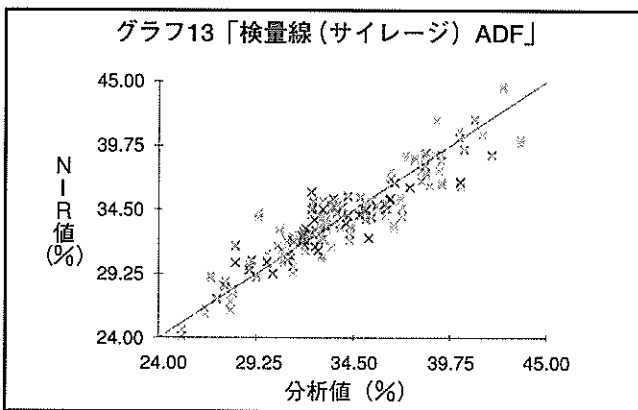
波 長：1618,2372nm

相関係数：0.91

標準誤差：1.55

分析値とNIR値との差

NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
7	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	29.89	32.36	8.26
8	チモシー	1 番草	出穂期	34.93	35.62	1.98
9				35.90	36.32	1.18
10				36.61	36.18	-1.17
11	リードカナリーグラス	2 番草	出穂期	38.36	36.88	-3.86
12		3 番草		31.48	34.20	8.62
13	ローズグラス	1 番草	出穂期	29.26	32.16	9.89



⑭ 中性デタージェント繊維（NDF）

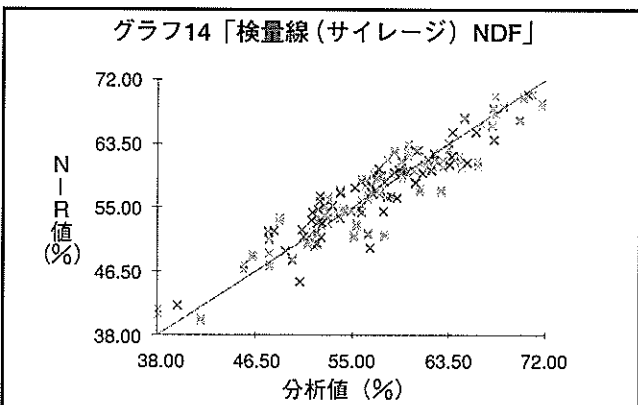
波 長：1758,2326nm

相関係数：0.93

標準誤差：2.41

分析値とNIR値との差

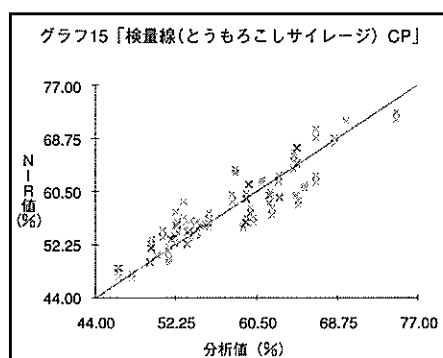
NO.	草 種	番 草	生育期	分析値	NIR値	誤差(%)
7	オーチャードグラス	1 番草	出穂期	59.46	59.03	-0.73
8	チモシー	1 番草	出穂期	62.00	62.34	0.54
9				64.93	60.60	-6.67
10				60.55	59.10	-2.39
11	リードカナリーグラス	2 番草	出穂期	64.56	61.21	-5.19
12		3 番草		60.11	60.74	1.04
13	ローズグラス	1 番草	出穂期	59.10	59.86	1.29



13.4.3 とうもろこしサイレージ (開発中)

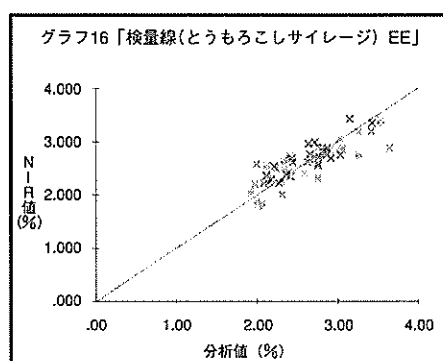
① 粗蛋白質 (CP)

波 長
2166nm
相関係数
0.92
標準誤差
0.40



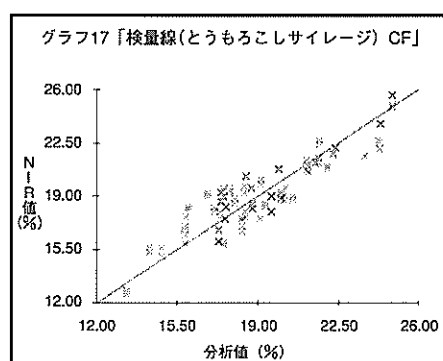
② 粗脂肪 (EE)

波 長
2310nm
相関係数
0.83
標準誤差
0.24



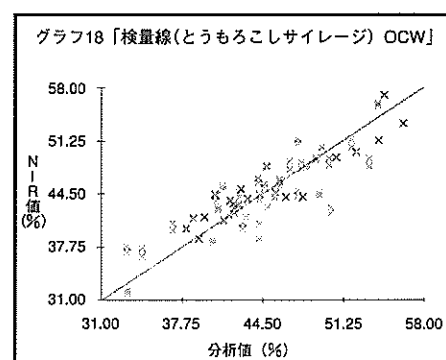
③ 粗繊維 (CF)

波 長
2250nm
相関係数
0.90
標準誤差
1.17



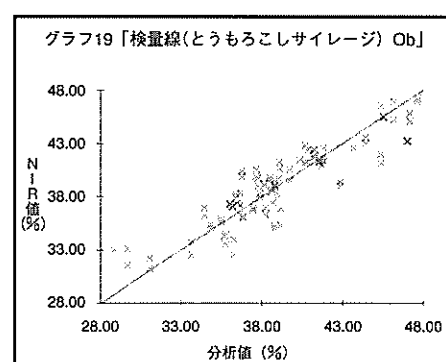
④ 有機細胞壁物質 (OCW)

波 長
2252nm
相関係数
0.87
標準誤差
2.60



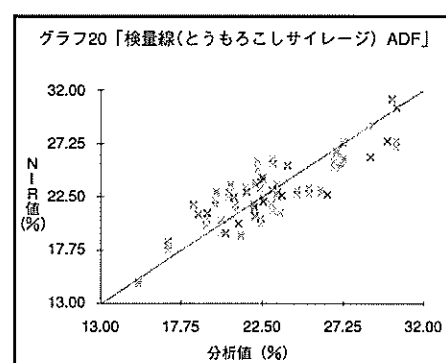
⑤ 有機細胞壁物質分画 (Ob)

波 長
1752nm
相関係数
0.90
標準誤差
1.79



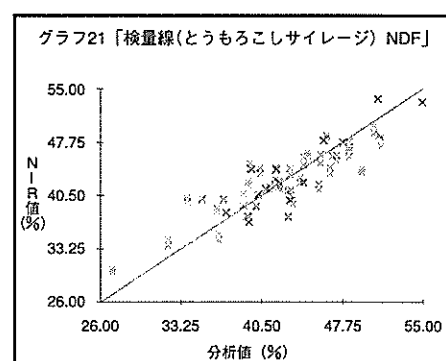
⑥ 酸性デタージェント繊維 (ADF)

波 長
2252nm
相関係数
0.86
標準誤差
1.81



⑦ 中性デタージェント繊維 (NDF)

波 長
2260nm
相関係数
0.86
標準誤差
2.63



13.4.4 アルファルファ乾草（開発中）

① 粗蛋白質（CP）

波 長

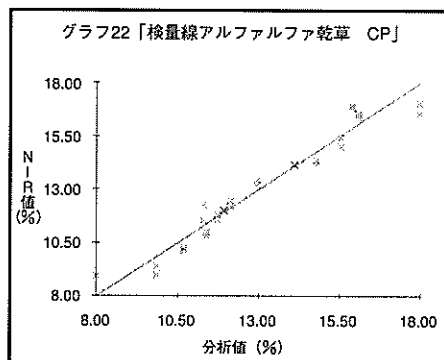
2324nm

相関係数

0.97

標準誤差

0.63



④ 有機細胞壁物質（OCW）

波 長

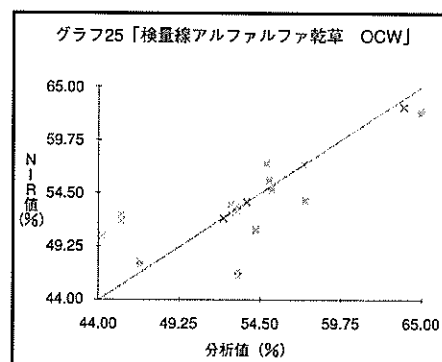
1746nm

相関係数

0.81

標準誤差

3.27



⑤ 有機細胞壁物質分画（Ob）

波 長

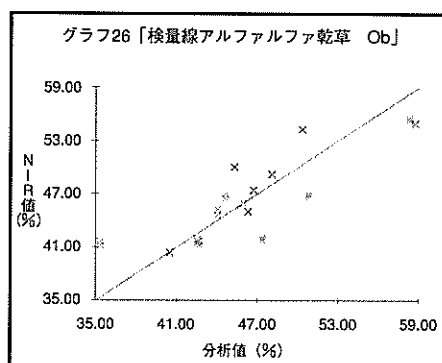
2058nm

相関係数

0.84

標準誤差

3.21



② 粗脂肪（EE）

波 長

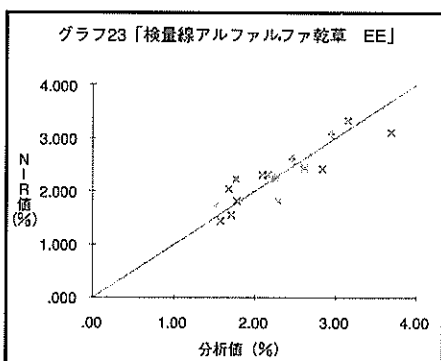
1792nm

相関係数

0.88

標準誤差

0.30



⑥ 酸性デタージェント繊維（ADF）

波 長

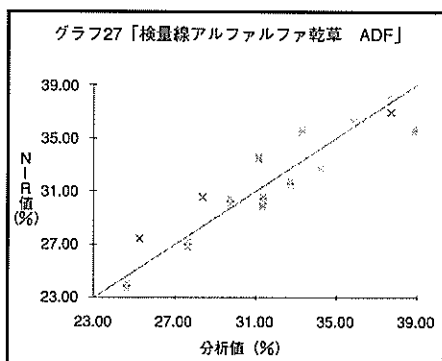
1760nm

相関係数

0.92

標準誤差

1.69



③ 粗繊維（CF）

波 長

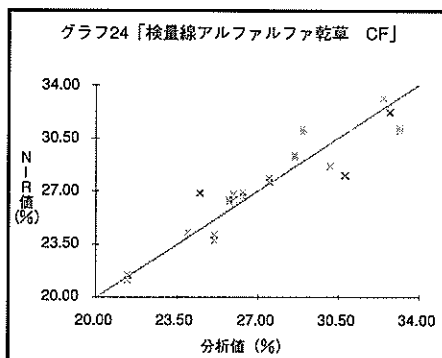
1760nm

相関係数

0.92

標準誤差

1.42



⑦ 中性デタージェント繊維（NDF）

波 長

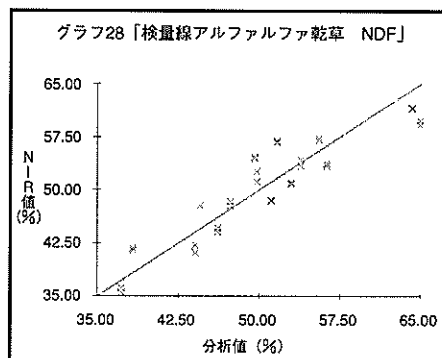
1232nm

相関係数

0.92

標準誤差

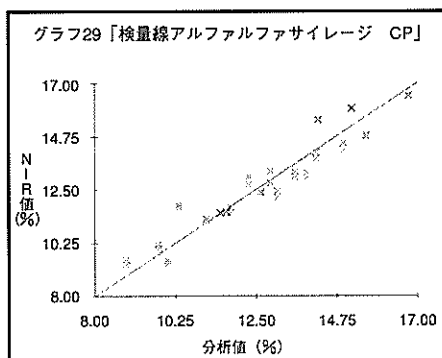
3.13



13.4.4 アルファルファサイレージ（開発中）

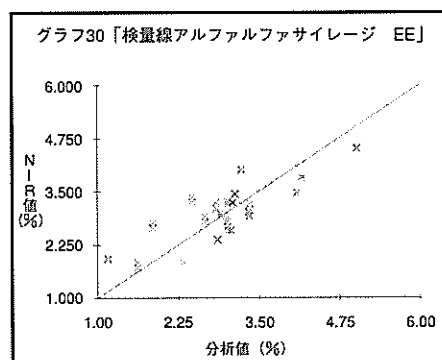
① 粗蛋白質（CP）

波 長
2170nm
相関係数
0.95
標準誤差
0.67



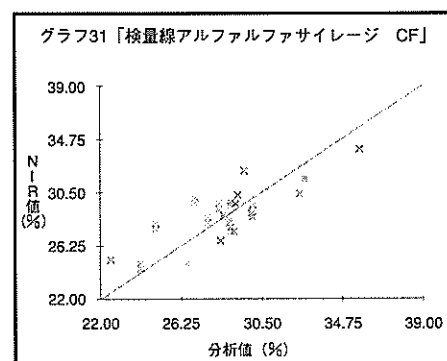
② 粗脂肪（EE）

波 長
2314nm
相関係数
0.81
標準誤差
0.49



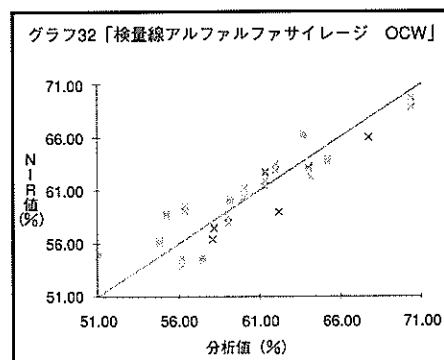
③ 粗繊維（CF）

波 長
1618nm
相関係数
0.78
標準誤差
2.75



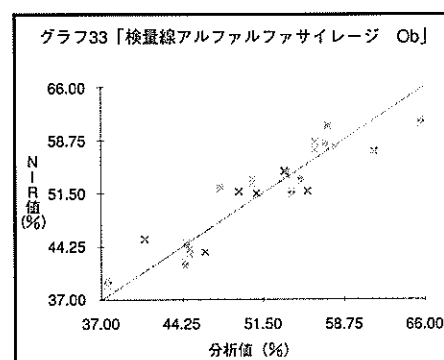
④ 有機細胞壁物質（OCW）

波 長
2380nm
相関係数
0.89
標準誤差
2.07



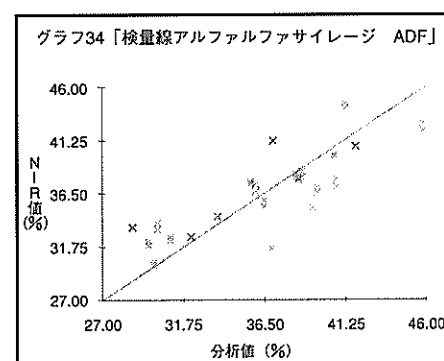
⑤ 有機細胞壁物質分画（Ob）

波 長
1668nm
相関係数
0.92
標準誤差
2.77



⑥ 酸性デタージェント繊維（ADF）

波 長
2378nm
相関係数
0.81
標準誤差
2.70



⑦ 中性デタージェント繊維（NDF）

波 長
2292nm
相関係数
0.96
標準誤差
1.66

