

技術レポート

3 モネンシンナトリウムの微生物学的試験法，液体クロマトグラフ法及び吸光光度法による定量法のほ乳期子牛育成用配合飼料に対する妥当性確認

関口 好浩^{*1}，嶋村 知紗^{*1}，大島 舞弓^{*1}，橋本 仁康^{*2}，
奥村 寿章^{*1}，加藤 まどか^{*3}，三枝 尚子^{*1}，千原 哲夫^{*2}

Method Validations of Microbiological Assay, Liquid Chromatography and Absorptiometry for Determination of Monensin Sodium in Formula Feed for Suckling Calves

Yoshihiro SEKIGUCHI^{*1}, Chisa SHIMAMURA^{*1}, Mayu OSHIMA^{*1}, Yoshiyasu HASHIMOTO^{*2},
Toshiaki OKUMURA^{*1}, Madoka KATO^{*3}, Naoko SAEGUSA^{*1}, Tetsuo CHIHARA^{*2}

(^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

(^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now Kobe Regional Center))

(^{*3} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now Nagoya Regional Center))

1 緒 言

モネンシンは，*Streptomyces cinnamonensis* の培養により得られるポリエーテル系の抗生物質である。我が国では，昭和 53 年に飼料安全法¹⁾に基づき，飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進を目的に，飼料添加物としてモネンシンナトリウム（以下「MN」という。）が指定された²⁾。

MN は，成分規格等省令³⁾で鶏（ブロイラーを除く。）用（幼すう用・中すう用）及びブロイラー用（前期用，後期用）飼料に 80 g(力価)/t，また牛用（肥育期用，幼令期用）飼料に 30 g(力価)/t の含有量で添加することが認められている。新たに，MN は，平成 27 年 12 月 7 日付けで，牛用（ほ乳期用）飼料（主として離乳後の牛の育成の用に供する配合飼料であって，脱脂粉乳を主原料とするもの以外のもの。）（以下「ほ乳期子牛育成用配合飼料」という。）に 30 g(力価)/t の含有量で添加することが認められた⁴⁾。

配合飼料中の MN の定量法としては，飼料分析基準⁵⁾に微生物学的試験法（平板法）（以下「微生物学的試験法」という。）及び液体クロマトグラフ法が収載されており，農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知⁶⁾に迅速定量法として吸光光度法が定められている。しかし，これらの試験法は，その検討当時，MN のほ乳期子牛育成用配合飼料への添加が認められていなかったため，ほ乳期子牛育成用配合飼料に対する妥当性確認等が行われていない。

^{*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肥飼料安全検査部，現 神戸センター

^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 名古屋センター

今回、ほ乳期子牛育成用配合飼料中の MN に対して微生物学的試験法を適用し、その妥当性を確認したので、その概要を報告する。また、液体クロマトグラフ法及び吸光光度法についても妥当性を確認し、更に3法の同等性を評価したので、併せて報告する。

2 実験方法

2.1 試料

1) MN 製剤

表示力価が 200 mg(力価)/g の製剤を用いた。

2) 希釈剤

粒径が 1 mm 以下の米ぬか油かすを用いた。

3) ほ乳期子牛育成用配合飼料

抗菌性物質が添加されていない市販のほ乳期子牛育成用配合飼料 5 種類をそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機 (ZM-200 Retsch 製 (使用時回転数 14000 rpm)) を用いて粉碎した。各配合飼料の配合割合等を表 1 に示した。

4) 分析試料

乳鉢を用いて MN 製剤を希釈剤と混合し、MN として 20 mg(力価)/g の希釈試料とした。さらに V 型混合機 (筒井理化学器械製, 缶体容量 2 L) を用いてこれを希釈剤と混合 (30 rpm, 15 分間) し、MN として 2 mg(力価)/g の希釈試料とした。同様にこの希釈試料と各配合飼料を混合し、MN として 15, 30 及び 45 g(力価)/t 含有するほ乳期子牛育成用配合飼料をそれぞれ調製した。

表 1 検討に用いた配合飼料の配合割合等

飼料の種類	原材料の区分	配合割合 (%)	原材料名
A ほ乳期子牛育成用・若令牛育成用・めん羊等用配合飼料	穀類	53	とうもろこし, 末粉, デキストリン
	植物性油かす類	34	大豆油かす, コーングルテンミール
	そうこう類	10	ふすま, 米ぬか
	その他	3	炭酸カルシウム, 植物性油脂, 食塩, リン酸カルシウム, 無水ケイ酸, 飼料添加物
B ほ乳期子牛育成用配合飼料	穀類	49	とうもろこし, 大麦, きな粉, 小麦粉
	植物性油かす類	28	大豆油かす, コーングルテンミール, なたね油かす
	そうこう類	9	ふすま
	その他	14	糖蜜, ビートパルプ, アルファルファミール, 炭酸カルシウム, 食塩, リン酸カルシウム, 飼料添加物
C ほ乳期子牛育成用配合飼料	穀類	54	とうもろこし, えん麦, ライ麦
	植物性油かす類	28	大豆油かす, なたね油かす
	そうこう類	9	コーングルテンフィード
	動物質性飼料	2	乾燥ホエー
	その他	7	糖蜜, りんごジュースかす, 炭酸カルシウム, 食塩, パン酵母培養液, 飼料添加物
D ほ乳期子牛育成用配合飼料	穀類	44	とうもろこし, ライ麦
	植物性油かす類	28	大豆油かす, なたね油かす
	そうこう類	21	コーングルテンフィード, 米ぬか, ふすま
	動物質性飼料	3	乾燥ホエー
	その他	4	炭酸カルシウム, 糖蜜, 食塩, トルラ酵母, サッカロマイセス・セレビスエ酵母, 飼料添加物
E ほ乳期子牛育成用配合飼料	穀類	60	加熱処理とうもろこし, とうもろこし, 加熱処理えん麦, 加熱処理大麦, マイロ, エクストルーダー処理大豆, 小麦粉, 玄米, でん粉
	植物性油かす類	29	大豆油かす
	そうこう類	3	ふすま, 米ぬか
	その他	8	糖蜜, アルファルファミール, 炭酸カルシウム, 食塩, 飼料用酵母, パン酵母, 麹菌, 甘草抽出物, ステビア, パナナ粉末, 無水ケイ酸, クエン酸, カシューナッツ殻油, トレハロース, 飼料添加物

2.2 微生物学的試験法

2.2.1 試薬

1) 水は、特記した場合を除き蒸留水（JIS K 0211 の 5213 に定義された蒸留水）を高圧蒸気滅菌器を用いて 121 °C で 15 分間滅菌（以下「高圧蒸気滅菌」という。）したものをを用いた。試薬は、特記した場合を除き特級を用いた。

2) 緩衝液

i 3号緩衝液

飼料分析基準に準じて調製した。

ii 5号緩衝液

飼料分析基準に準じて調製した。

3) 抽出溶媒

メタノール-水 (9+1)

4) 各標準液等

常用標準品は、成分規格等省令³⁾の規定に基づき独立行政法人農林水産消費安全技術センターが指定した標準製剤を用いた。

i モネンシン標準液

常用標準モネンシン (974.13 μg (力価)/mg) 40 mg 以上を正確に量り、メタノールを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のモネンシン標準原液を調製した。

使用に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、モネンシン標準液を調製した。高濃度標準液は2 μg (力価)/mL に、低濃度標準液は0.5 μg (力価)/mL に調製した。

妨害物質の検討に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、0.2, 1 及び 5 μg (力価)/mL の各モネンシン標準液を調製した。

ii バシトラシン標準液

常用標準バシトラシン (78.7 単位/mg) 適量を真空定温乾燥器を用いて 0.67 kPa 以下、60 °C で 3 時間乾燥 (以下「減圧乾燥」という。) した後、40 mg 以上を正確に量り、3 号緩衝液を正確に加えて溶かし、100 単位/mL のバシトラシン標準原液を調製した。

妨害物質の検討に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、0.04, 0.2 及び 1 単位/mL の各バシトラシン標準液を調製した。

iii オキシテトラサイクリン標準液

常用標準オキシテトラサイクリン (922 μg (力価)/mg) 40 mg 以上を正確に量り、塩酸 (0.01 mol/L) を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のオキシテトラサイクリン標準原液を調製した。

妨害物質の検討に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、0.2, 1 及び 5 μg (力価)/mL の各オキシテトラサイクリン標準液を調製した。また、標準原液の一定量を抽出溶媒で正確に希釈し、10 及び 20 μg (力価)/mL のオキシテトラサイクリン標準液を調製した。

iv クロルテトラサイクリン標準液

常用標準クロルテトラサイクリン (921 μg (力価)/mg) 適量を減圧乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、水を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のクロルテトラサイクリン標準原液を調製した。

妨害物質の検討に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、0.2, 1 及び 5 μg (力価)/mL の各クロルテトラサイクリン標準液を調製した。また、標準原液の一定量を抽出溶媒で正確に希釈し、10 及び 20 μg (力価)/mL のクロルテトラサイクリン標準液を調製した。

v コリスチン標準液

常用標準コリスチン (703 μg (力価)/mg) 適量を減圧乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、5 号緩衝液を正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のコリスチン標準原液を調製した。

妨害物質の検討に際して、標準原液の一定量を水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、

0.2, 1 及び 5 µg(力価)/mL の各コリスチン標準液を調製した。

5) 塩基性アルミナ

榎本ら⁷⁾の検討に基づき、カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ (Aluminium oxide 90 active basic, 0.063-0.200 mm, Merck Millipore 製) を乾燥器を用いて 130 °C で 2 時間乾燥し、気密容器に入れ、塩基性アルミナ 94 g に対して水 6 mL を加えてよく混和した後、一夜静置し、Brockmann スケール⁸⁾の活性度 III (水分 6 v/w%) に調整した。

6) F-22 号培地

飼料分析基準に準じて調製した。

7) 孢子液

試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^7 CFU/mL の孢子液を調製した。

8) 寒天平板

高圧蒸気滅菌した後、49~51 °C に保温した F-22 号培地に、孢子液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加えて十分にかき混ぜ、その 10 mL をペトリ皿 (内径 90 mm, 高さ 20 mm) に一様に広がる様に分注した後、水平に静置して凝固させ、平板とした。円筒投下機を用い、平板上の半径 25 mm の円周上の相隣する各々が中心に対して 90°の間隔となる位置に、4 個の円筒 (外径 8 mm, 内径 6 mm, 高さ 10 mm, ステンレス製) を置いた。

2.2.2 装置及び器具

1) 阻止円測定装置 : ZONE ANALYZER ZA-F システムサイエンス製

2) ノギス : Digimatic Caliper ミットヨ製

2.2.3 定量方法

1) 抽出

分析試料の一定量 (MN として 0.3 mg(力価)相当量又は 10.0 g) を正確に量って 100 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 50 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて 20 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過し、ろ液をカラム処理に供した。

2) カラム処理

塩基性アルミナ 12 g をカラム管 (内径 14 mm) に乾式で充てんし、カラムを調製した。

1)のろ液をカラムに入れ、初めの流出液 5 mL を捨てた。その後の流出液の一定量を水で正確に 3 倍希釈し、高濃度試料溶液 (0.3 mg(力価)相当量採取の場合は 2 µg(力価)/mL, 10 g 採取の場合は 1~3 µg(力価)/mL) を調製し、更にこれを水-メタノール (7+3) で正確に 4 倍希釈し、低濃度試料溶液 (0.3 mg(力価)相当量採取の場合 0.5 µg(力価)/mL, 10 g 採取の場合は 0.25~0.75 µg(力価)/mL) を調製した。

3) 分注及び培養

寒天平板 5 枚を用い、飼料分析基準第 9 章第 1 節 C の 1)に準じ、高濃度及び低濃度の標準液並びに試料溶液をそれぞれ 250 µL ずつ各円筒に分注し、恒温器を用いて 10 °C で 2 時間静置した後、37 °C で 16~20 時間培養した。

4) 阻止円直径の測定及び計算

飼料分析基準第 9 章第 1 節 C の 1)に準じて、阻止円測定装置又はノギスを用いて阻止円直径を測定し、2-2 用量法に基づき計算を行って飼料中の MN 濃度を求めた。

2.3 液体クロマトグラフ法

2.3.1 試薬

- 1) 水は、超純水（JIS K 0211 に定める 5218 に定義された超純水）を用いた。メタノールは、モネンシン標準原液の調製に用いたもの以外は液体クロマトグラフ用を用いた。その他の試薬は、特級を用いた。
- 2) モネンシン標準液
2.2.1 の 4)の i)により調製したモネンシン標準原液の一定量をメタノール-水（9+1）で正確に希釈し、0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 及び 15 μg (力価)/mL の各モネンシン標準液を調製した。
- 3) 抽出溶媒　メタノール-水（9+1）

2.3.2 装置及び器具

- 1) メンブランフィルター：エキクロディスク 13CR　日本ポール製（孔径 0.45 μm , PTFE）
- 2) 液体クロマトグラフ装置
オートサンプラー：SIL-20AC　島津製作所製
溶離液用ポンプ：LC-20AD　島津製作所製
カラム恒温槽：CTO-20A　島津製作所製
反応液用ポンプ：LC-20AD　島津製作所製
反応槽：CRB-6A　島津製作所製
紫外可視吸光光度検出器：SPD-20AV　島津製作所製

2.3.3 定量方法

- 1) 抽出
分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて 20 分間かき混ぜて抽出した。抽出液をろ紙（5 種 A）でろ過した後、さらにメンブランフィルターでろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。
- 2) 液体クロマトグラフィー
試料溶液及び各モネンシン標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得た。測定条件を表 2 に示した。
なお、MN は MN-A, MN-B, MN-C 及び MN-D の混合物であるが、飼料添加物として指定されているものは MN-A を主成分とするものであり、早川ら⁹⁾による液体クロマトグラフ法における MN 定量法の検討と同様、本法では、MN-A を定量物質とした。
- 3) 計算
得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の MN 濃度を求めた。

表 2 液体クロマトグラフ法の測定条件

カラム	Shim-pack VP-ODS (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 μ m), 島津製作所製
溶離液	メタノール-水-酢酸 (94:6:0.1)
検出器	紫外可視吸光度検出器 (520 nm)
反応液 ^{a)}	メタノール-硫酸-バニリン (95:2:3, v/v/w)
流速	溶離液 0.6 mL/min, 反応液 0.6 mL/min
温度	カラムオープン 40 °C, 反応槽 95 °C
反応コイル	内径 0.5 mm, 長さ 5 m

a) 用時調製し, 遮光容器に入れて使用

2.4 吸光光度法

2.4.1 試薬

1) 水は, 蒸留水 (JIS K 0211 の 5213 に定義された蒸留水) を高圧蒸気滅菌したものをを用いた. 試薬は, 特記した場合を除き特級を用いた. エタノールは, JIS K 8101 に定めるエタノール (99.5) の特級を用いた.

2) 各標準液

i モネンシン標準液

常用標準モネンシン 20 mg(力価) 相当量を正確に量り, エタノールを正確に加えて溶かし, 400 μ g(力価)/mL のモネンシン標準原液を調製した.

使用に際して, 標準原液の一定量をエタノールで正確に希釈し, 6 μ g(力価)/mL のモネンシン標準液を調製した. また, 妨害物質の検討に際しては, 標準原液の一定量をエタノールで正確に希釈し, 3 及び 6 μ g(力価)/mL のモネンシン標準液を調製した.

ii バシトラシン標準液

常用標準バシトラシン適量を減圧乾燥した後, 40 mg 以上を正確に量り, エタノール-水 (4+1) を正確に加えて溶かし, 100 単位/mL のバシトラシン標準原液を調製した.

妨害物質の検討に際して, 標準原液の一定量をエタノールで正確に希釈し, 0.42 及び 0.84 単位/mL のバシトラシン標準液を調製した.

iii オキシテトラサイクリン標準液

常用標準オキシテトラサイクリン 40 mg 以上を正確に量り, エタノール-水 (4+1) を正確に加えて溶かし, 1 mg(力価)/mL のオキシテトラサイクリン標準原液を調製した.

妨害物質の検討に際して, 標準原液の一定量をエタノールで正確に希釈し, 5 及び 10 μ g(力価)/mL オキシテトラサイクリン標準液を調製した.

iv クロルテトラサイクリン標準液

常用標準クロルテトラサイクリン適量を減圧乾燥した後, 40 mg 以上を正確に量り, エタノール-水 (4+1) を正確に加えて溶かし, 1 mg(力価)/mL のクロルテトラサイクリン標準原液を調製した.

妨害物質の検討に際して, 標準原液の一定量をエタノールで正確に希釈し, 5 及び 10 μ g(力価)/mL のクロルテトラサイクリン標準液を調製した.

v コリスチン標準液

常用標準コリスチン適量を減圧乾燥した後, 40 mg 以上を正確に量り, 水を正確に加え

て溶かし、1 mg(力価)/mL のコリスチン標準原液を調製した。

妨害物質の検討に際して、標準原液の一定量をエタノールで正確に希釈し、2 及び 4 μg (力価)/mL のコリスチン標準液を調製した。

3) 硫酸-エタノール溶液

エタノール 30 mL に硫酸 1 mL を徐々に加え、さらにエタノールを加えて 100 mL としたものを用時調製した。

4) *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液

p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 600 mg を量り、エタノール 50 mL を加えて溶かした後、硫酸 1 mL を徐々に加え、更にエタノールを加えて 100 mL とした。用時調製した。

2.4.2 装置及び器具

1) 恒温水槽：TRW-42TP アズワン製

2) 紫外可視分光光度計：UVmini 1240 島津製作所製

2.4.3 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、エタノール 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて 10 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過し、試料溶液とした。

2) 発色

試料溶液 10 mL を 50 mL の共栓試験管 A, B 及び C にそれぞれ入れ、試験管 A 及び B にエタノール 5 mL、試験管 C にモネンシン標準液 5 mL をそれぞれ加えた。さらに試験管 A に硫酸-エタノール溶液 5 mL、試験管 B 及び C に *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液 5 mL をそれぞれ加えた。これらを混合した後、恒温水槽を用いて 70 ± 1 °C で 20 分間加温して発色させた。

3) 測定

室温で 30 分間放冷した後、試験管 A, B 及び C 中の溶液を、エタノールを対照液として、紫外可視分光光度計を用いて波長 578 nm でそれぞれの吸光度 a , b 及び c を測定した。同時に、試料と同一の原料組成の MN 無添加対照試料について、上記と同様の操作を行い、吸光度 a' , b' 及び c' を測定した。

4) 計算

次式により試料中の MN 濃度を算出した。

$$\text{試料中の MN 濃度 (g(力価)/t)} = \left(\frac{b-a}{c-b}\right) \times 30 - \left(\frac{b'-a'}{c'-b'}\right) \times 30$$

3 結果及び考察

3.1 微生物学的試験法

3.1.1 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を検証するため、添加回収試験を実施した。

1) 試料採取量をモネンシン添加濃度に対応した量とした場合

採取する試料の量を MN 添加濃度に対応した量とした場合の定量値の確認を行った。2.1

の4)の分析試料をMNとして0.3 mg(力価)相当量 (MN含有量 15, 30 及び 45 g(力価)/tの各試料について, それぞれ 20, 10 及び 6.67 g) 量り, 本法に従って日を変えて3回分析を実施し, その回収率を求めた. 結果は表3のとおり, 平均回収率は91.7~105.9%, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として8.3%以下と良好な結果であった.

2) 試料採取量を一定の10 gとした場合

添加濃度に関わらず, 採取する試料の量を一定の10 gとした場合の定量値の確認を行った. MN含有量15及び45 g(力価)/tの試料について, それぞれ10 g量り, 本法に従って1回分析を実施した. その結果は表4のとおり, 回収率は97.1~104.3%であった. また, ここで得られた回収率及び3.1.1 1)で得られた平均回収率について *t*-検定を行ったところ, MN含有量15 g(力価)/tの試料では $t(4) = 0.47$, $p = 0.66$, MN含有量45 g(力価)/tの試料では $t(4) = 2.5$, $p = 0.066$ で, 有意差は認められなかった. このことから, 飼料中のMN含有量が15~45 g(力価)/tの範囲において, 試料採取量を一定の10 gとしても定量可能であることが確認できた.

表3 微生物学的試験法によるMNの添加回収試験結果 (試料採取量: 0.3 mg(力価)相当)

添加濃度 (g(力価)/t)	A		B		C		D		E	
	回収率 ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	回収率 ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	回収率 ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	回収率 ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	回収率 ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
15	99.1	5.9	103.9	3.2	105.0	2.8	105.9	8.3	91.7	1.8
30	98.6	2.3	102.4	1.9	102.9	5.3	105.7	6.4	96.4	2.0
45	105.1	5.7	101.7	2.3	102.0	5.2	103.5	0.8	99.6	4.3

a) $n=3$ の平均値

b) 繰返し精度の相対標準偏差

表4 微生物学的試験法によるMNの添加回収試験結果
(試料採取量: 10 g)

添加濃度 (g(力価)/t)	回収率 ^{a)} (%)				
	A	B	C	D	E
15	97.1	104.3	101.7	101.3	97.1
45	99.0	100.6	100.8	100.2	98.8

a) $n=1$

3.1.2 妨害物質の検討

現在, 飼料添加物に指定されている抗生物質のうち, 牛用配合飼料においてMNとの併用が認められているのは, 亜鉛バシトラシン (以下「BC」という.), アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン (以下「OTC」という.), クロルテトラサイクリン (以下「CTC」という.), 硫酸コリスチン (以下「CL」という.) である. 過去の妨害物質の検討において, 小山¹⁰⁾がプレミックス中の抗生物質の微生物学的試験法の検討をした際に, OTC及びCTCは*Bacillus subtilis* ATCC 6633に対して感受性があるが, カラムクロマトグラフィーによる精製の段階で塩基性アルミナに吸着されるため, MNの定量を妨害しないことを確認している.

今回、ほ乳期子牛育成用配合飼料に対して MN との併用が認められている BC, OTC, CTC 及び CL が、MN の定量を妨害する可能性について確認した。

モネンシン (0.2, 1, 5 μg (力価)/mL) , バシトラシン (0.04, 0.2, 1 単位/mL) , オキシテトラサイクリン (0.2, 1, 5 μg (力価)/mL) , クロルテトラサイクリン (0.2, 1, 5 μg (力価)/mL) 及びコリスチン (0.2, 1, 5 μg (力価)/mL) の各標準液を用い、2.2.3 の 3)及び 4)の方法に準じて試験を実施した。その結果、BC 及び CL は試験を実施した濃度範囲では、阻止円が認められなかったことから、併用されても MN の定量を妨害しないことが確認できた。しかし、小山の結果と同様に、図 1 のとおり、OTC は 5 μg (力価)/mL の濃度で、CTC は 1 及び 5 μg (力価)/mL の濃度で阻止円が認められたが、それ以下の濃度では阻止円が認められなかった。なお、ほ乳期子牛育成用配合飼料に MN と各抗生物質が併用された場合に、MN の最終試料溶液中には、BC で 0.01~0.28 単位/mL, OTC で 0.33~3.33 μg (力価)/mL, CTC で 0.17~3.33 μg (力価)/mL, CL で 0.33~1.33 μg (力価)/mL 含まれることとなる。

そこで、OTC 及び CTC について、ほ乳期子牛育成用配合飼料への最大添加濃度 (OTC, CTC 共に 50 g(力価)/t) 及びその 2 倍濃度を含む試料からの抽出濃度となるよう調製した標準液 (OTC, CTC 共に 10 及び 20 μg (力価)/mL) を用い、2.2.3 の方法に準じて試験を実施した。その結果、OTC 及び CTC は、小山の結果と同様に、共に阻止円が認められず、カラムクロマトグラフィーによる精製の段階で塩基性アルミナに吸着され、MN の定量を妨害しないことが確認できた。

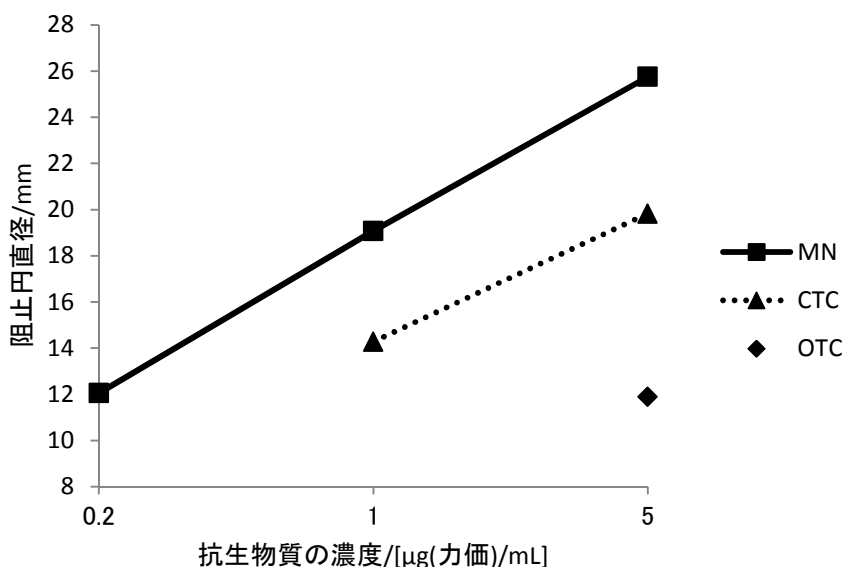


図 1 MN, OTC 及び CTC の感受性曲線

Bacillus subtilis ATCC 6633 : 0.5×10^5 CFU/mL (F-22 号培地, 円筒法)

CTC 0.2 μg (力価)/mL, OTC 0.2 及び 1 μg (力価)/mL では阻止円が認められなかった。

3.2 液体クロマトグラフ法

3.2.1 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を検証するため、添加回収試験を実施した。

2.1 の 4)の分析試料について、それぞれ本法に従って 3 回分析を実施し、回収率を求めた。結果は表 5 のとおり、平均回収率は 93.3~98.2 %，その繰返し精度は RSD_r として 2.7 %以下と、良好な結果であった。

表 5 液体クロマトグラフ法による MN の添加回収試験結果

添加濃度 (g(力価)/t)	A		B		C		D		E	
	回収率 ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	回収率 ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	回収率 ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	回収率 ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	回収率 ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
15	94.4	2.2	94.9	1.8	93.3	0.9	94.9	1.0	95.1	1.9
30	98.2	1.2	97.7	2.3	95.4	0.9	96.9	1.4	93.8	1.3
45	96.0	1.0	95.3	1.0	96.5	2.7	96.6	0.5	96.1	1.2

a) $n=3$ の平均値

b) 繰返し精度の相対標準偏差

3.2.2 妨害物質の検討

早川ら⁹⁾が液体クロマトグラフによる MN の定量法を検討した際、配合飼料に添加可能な抗生物質（当時、飼料添加物に未指定で未検討のナラシン（以下「NR」という。）を除く。）は、MN の定量を妨害しないことを確認している。また、千原¹¹⁾は、液体クロマトグラフによる NR の定量法を検討した際、MN と NR のピークの分離状況は良好で、MN は NR の定量を妨害しないことを確認している。これらのことから、NR は MN の定量を妨害しないと考えられた。

なお、2.1 の 3)に示したほ乳期子牛育成用配合飼料 5 種類について、本法に従って分析したところ、定量を妨害するピークは認められなかった。ほ乳期子牛育成用配合飼料 C のクロマトグラムを図 2 に示した。

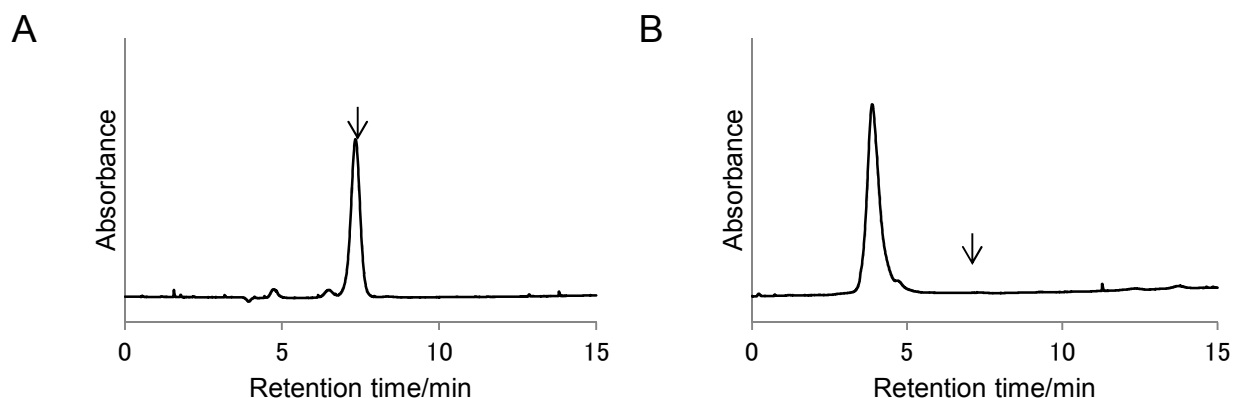


図 2 MN 標準液と MN 無添加飼料のクロマトグラム
(縦軸のスケールは左右のクロマトグラムで同じ。

矢印は MN-A の保持時間を示す。)

A : 標準液 (1 μg (力価)/mL : MN として 20 ng(力価))

B : ほ乳期子牛育成用配合飼料 C (ブランク)

3.3 吸光光度法

3.3.1 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を検証するため、添加回収試験を実施した。

2.1 の 4)の分析試料について、それぞれ本法に従って3回分析を実施し、回収率を求めた。結果は表6のとおり、平均回収率は89.9~95.8%，その繰返し精度はRSD_rとして5.3%以下と、良好な結果であった。

表6 吸光光度法によるMNの添加回収試験結果

添加濃度 (g(力価)/t)	A		B		C		D		E	
	回収率 ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	回収率 ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	回収率 ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	回収率 ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	回収率 ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
15	93.8	3.0	94.6	1.6	95.8	5.3	92.6	2.0	94.0	1.7
30	93.5	1.1	93.6	2.9	91.5	1.0	92.9	3.4	89.9	0.5
45	92.9	0.9	90.8	0.9	91.4	3.1	92.4	1.1	90.4	1.2

a) n=3 の平均値

b) 繰返し精度の相対標準偏差

3.3.2 妨害物質の検討

ほ乳期子牛育成用配合飼料へのMNとの併用が認められているBC, OTC, CTC及びCLが、MNの定量を妨害する可能性について確認した。

BC, OTC, CTC及びCLについて、ほ乳期子牛育成用配合飼料への最大添加濃度（BC：420万単位/t, CL：20g(力価)/t, OTC：50g(力価)/t, CTC：50g(力価)/t）及びその2倍濃度を含む試料からの抽出濃度となるよう調製した各標準液を用い、2.4.3に準じて、試験管Bに係る試料溶液を各標準液に代えて実施し、各抗生物質とp-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液との反応による発色の有無を確認した。また、陽性対照としてMN、ブランクとしてエタノールについても、同様の操作を行った。その結果は表7のとおり、各抗生物質の吸光度はブランクの吸光度とほぼ同じ値であり、MNとの併用が認められている抗生物質は、MNの定量を妨害しないことが確認できた。

表7 MN との併用が認められている各抗生物質の吸光度

抗生物質		濃度	吸光度 ^{a)}
BC	最大	0.42 単位/mL	0.0025
	最大の2倍	0.84 単位/mL	0.0027
OTC	最大	5.0 µg(力価)/mL	0.0021
	最大の2倍	10 µg(力価)/mL	0.0021
CTC	最大	5.0 µg(力価)/mL	0.0019
	最大の2倍	10 µg(力価)/mL	0.0018
CL	最大	2.0 µg(力価)/mL	0.0021
	最大の2倍	4.0 µg(力価)/mL	0.0020
MN	最大	3.0 µg(力価)/mL	0.1458
	最大の2倍	6.0 µg(力価)/mL	0.2924
ブランク		—	0.0030

a) $n=3$ の平均値

3.4 3法の評価及び定量値の比較

表3, 5及び6のとおり, 各試験法による添加回収試験の回収率及びその繰返し精度の結果から, 3法共に試験法の妥当性が確認できた。

また, 液体クロマトグラフ法及び吸光光度法の試験結果が微生物学的試験法の試験結果と差がないことを確認するため, それぞれの平均回収率について t -検定を行った。その結果は表8のとおり, MN含有量 15 g(力価)/t の試料については共に有意差はなかったが, 30及び45 g(力価)/t の試料については有意差が認められた。しかし, 前述のとおり妥当性の確認結果は良好であり, 実用上は問題ないと判断した。

表8 t -検定の結果

添加濃度 (g(力価)/t)	分析法の組み合わせ	自由度	検定統計量	p 値
15	微生物学的試験法 - 液体クロマトグラフ法	4	2.37	0.077
	微生物学的試験法 - 吸光光度法	4	2.64	0.057
30	微生物学的試験法 - 液体クロマトグラフ法	4	3.08	0.037
	微生物学的試験法 - 吸光光度法	4	6.18	0.003
45	微生物学的試験法 - 液体クロマトグラフ法	4	6.85	0.002
	微生物学的試験法 - 吸光光度法	4	22.76	0.000

4 まとめ

ほ乳期子牛育成用配合飼料中のモネンシンナトリウムに対して微生物学的試験法、液体クロマトグラフ法及び吸光光度法を適用し、その妥当性を確認し、3 法の同等性を評価したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 飼料分析基準に記載されている微生物学的試験法による添加回収試験を 5 種類のほ乳期子牛育成用配合飼料について実施した結果、平均回収率は 91.7~105.9 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 8.3 %以下であった。また、併用可能な亜鉛バシトラシン、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及び硫酸コリスチンは、モネンシンナトリウムの定量を妨害しないことが確認できた。
- 2) 飼料分析基準に記載されている液体クロマトグラフ法による添加回収試験を 5 種類のほ乳期子牛育成用配合飼料について実施した結果、平均回収率は 93.3~98.2 %、その繰返し精度は RSD_r として 2.7 %以下であった。また、定量を妨害するピークは確認されなかった。
- 3) 通知に規定されている吸光光度法による添加回収試験を 5 種類のほ乳期子牛育成用配合飼料について実施した結果、平均回収率は 89.9~95.8 %、その繰返し精度は RSD_r として 5.3 %以下であった。また、併用可能な亜鉛バシトラシン、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及び硫酸コリスチンは、モネンシンナトリウムの定量を妨害しないことが確認できた。
- 4) 微生物学的試験法、液体クロマトグラフ法及び吸光光度法の 3 法の試験結果に有意差が認められたが、各試験法による添加回収試験の回収率及びその繰返し精度の結果から、いずれの試験法もほ乳期子牛育成用配合飼料への適用が可能と考えられた。

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) 農林省告示：飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律の規定に基づき飼料添加物を定める件，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省告示第 750 号 (1976)。
- 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，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976)。
- 4) 農林水産省令：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，平成 27 年 12 月 7 日，農林水産省令第 82 号 (2015)。
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008)。
- 6) 農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について，昭和 53 年 9 月 5 日，53 畜 B 第 2173 号・53 水振第 464 号 (1978)。
- 7) 榎本 舞弓，橋本 仁康，山多 利秋：ポリエーテル系抗生物質の微生物学的定量法に用いる塩基性アルミナについて，飼料研究報告，40，150-157 (2015)。
- 8) Hans Brockmann, Hella Schodder.: Aluminiumoxyd mit abgestuftem adsorptionsvermögen zur chromatographischen adsorption, Chem. Ber., 74, 73-78 (1941)。

- 9) 早川 俊明, 牧野 大作 : 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のモネンシンナトリウムの定量, 飼料研究報告, **26**, 60-68 (2001).
- 10) 小山 敬之 : プレミックス中の抗生物質の定量法の検討, 飼料研究報告, **6**, 163-326 (1980).
- 11) 千原 哲夫 : 高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のナラシンの定量, 飼料研究報告, **27**, 94-101 (2002).