

6 配合飼料中のサリノマイシンナトリウム, センデュラマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムの液体クロマトグラフ質量分析計による一斉微量定量法

牧野 大作*, 山田 美帆*

Simultaneous Microdetermination of Salinomycin Sodium, Semduramicin Sodium, Narasin, Monensin Sodium and Lasalocid Sodium in Formula Feeds by LC-MS

Daisaku MAKINO* and Miho YAMADA*

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

A simultaneous analytical method for microdetermination of five polyether antibiotics (salinomycin sodium (SL), semduramicin sodium (SD), narasin (NR), monensin sodium (MN) and lasalocid sodium (LS)) in formula feeds using liquid chromatograph-electrospray ionization-mass spectrometer (LC-ESI-MS) was developed. These antibiotics in formula feeds were extracted with acetonitrile. The extract was filtrated with a filter paper. After the filtrates of 25 mL were evaporated to dryness, they were dissolved in hexane-ethyl acetate (9:1). The whole solutions were applied to silica-gel mini column. The solutions were washed with hexane-ethyl acetate (9:1), and then eluted with hexane-ethanol (4:1) and subjected to LC-ESI-MS for determination of antibiotics. The LC separation was carried out on an ODS column (Phenomenex Gemini 5 μ C18 110 Å, 2 mm i.d.×150 mm, 5 μ m) using acetonitrile-5 mmol/L ammonium acetate (4:1) as a mobile phase. The determination was performed in a selected ion monitoring (SIM) mode. A recovery test was conducted using three kinds of formula feed added with each polyether antibiotic at levels of 0.5 and 5 g(potency)/tons. These resulted in the mean recovery of SL of 89.7~98.8%, and the relative standard deviations (RSD) of within 2.9%. These values were 80.0~90.0% and 10% for SD; 83.0~89.7% and 13% for NR; 104~109% and 1.5% for MN; and 85.2~94.5% and 4.5% for LS respectively. A collaborative study was conducted in eight laboratories using formula feed for layers added with each polyether antibiotic at 0.5 g(potency)/tons. The mean recovery of SL was 95.0%, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 2.7%, 6.4% and 0.36 respectively. These values were 98.6%, 2.6%, 8.0% and 0.45 for SD; 88.5%, 3.5%, 5.7% and 0.31 for NR; 101%, 3.6%, 5.0% and 0.28 for MN; and 93.3%, 3.8%, 8.2% and 0.46 for LS respectively.

Key words: 抗生物質 antibiotics ; ポリエーテル系抗生物質 polyether antibiotics ; サリノマイシンナトリウム salinomycin sodium ; センデュラマイシンナトリウム semduramicin sodium ; ナラシン narasin ; モネンシンナトリウム monensin sodium ; ラサロシドナトリウム lasalocid sodium ; 配合飼料 formula feed ; 液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) ; エレクトロスプレーイオン化法 electrospray ionization (ESI) ; 共同試験 collaborative study

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

1 緒 言

サリノマイシンナトリウム (SL) , センデュラマイシンナトリウム (SD) , ナラシン (NR) , モネンシンナトリウム (MN) 及びラサロシドナトリウム (LS) は, ポリエーテル系の抗生物質であり, 抗コクシジウム作用及びグラム陽性菌の一部に対する抗菌活性を示すことから, 飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進を用途として飼料添加物に指定¹⁾されている。

これらを含むことができる飼料の種類及び添加量は, 飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令²⁾に規定されており, 対象とする飼料以外の飼料には含んではない。

現在, サリノマイシンナトリウム, センデュラマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムの配合飼料中の定量法としては, 微生物学的定量法³⁾⁻¹⁰⁾及び液体クロマトグラフ法¹¹⁾⁻¹⁵⁾が報告されており, これらを基とした定量法が飼料分析基準¹⁶⁾に収載されている。

微量定量法としては, 配合飼料中に残留した微量のサリノマイシンナトリウム, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムをバイオオートグラフにより定量する方法¹⁷⁾が飼料分析基準に収載されているが, 16~24 時間の培養を伴うため, 迅速性に欠点がある。また, センデュラマイシンナトリウム及びナラシンについては, 微量定量法は収載されていない。

近年, 食品中及び飼料中に残留したポリエーテル系抗生物質の定量法としては, 迅速性及び簡便性の観点から, 液体クロマトグラフ質量分析計を用いた方法^{18), 19)}が報告されている。

そこで筆者らは, 前述の飼料分析基準に収載されているバイオオートグラフ法¹⁷⁾の試料溶液の調製方法を参考として, 液体クロマトグラフ質量分析計を用いたサリノマイシンナトリウム, センデュラマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムの一斉微量定量法を検討したので, その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試料の調製

抗菌性物質を含まない市販の配合飼料をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し, それぞれにサリノマイシンナトリウム製剤 (100 mg(力価)/g, 科学飼料研究所製), センデュラマイシンナトリウム製剤 (50 mg(力価)/g, コーキン化学製), ナラシン製剤 (100 mg(力価)/g, 日本イーライリリー販売), モネンシンナトリウム製剤 (200 mg(力価)/g, 科学飼料研究所製) 及びラサロシドナトリウム製剤 (150 mg(力価)/g, 科学飼料研究所製) を添加し, サリノマイシンナトリウム, センデュラマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムとしてそれぞれ 0.5 及び 5 g(力価)/t 相当量を含む試料を調製した。

添加回収試験に用いた配合飼料 (成鶏飼育用, 肉豚肥育用及び肉用牛肥育用) の配合割合は, Table 1 のとおりである。

Table 1 Compositions of the formula feeds used in this study

Kind of formula feed	Group of ingredients	Ratio (%)	Ingredients
For layer	Grains	59	Corn
	Oil meals	25	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn gluten meal
	Animal by-products	1	Fish meal
	Brans	1	Rice bran
	Others	14	Calcium carbonate, Calcium phosphate, Paprika extract, Feed additives
For finishing pig	Grains	78	Corn
	Brans	9	Wheat bran
	Oil meals	8	Soybean meal
	Animal by-products	3	Fish meal
	Others	2	Calcium phosphate, Calcium carbonate, Salt, Feed additives
For beef cattle	Grains	63	Corn, Milo, Barley
	Brans	18	Wheat bran, Rice bran, Corn gluten feed
	Oil meals	10	Soybean meal
	Others	9	Alfalfa, Molasses, Calcium carbonate, Salt, Feed additives

2.2 試薬等

1) サリノマイシンナトリウム標準原液

常用標準サリノマイシン（飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）別表第 2 の 6 の(13)に規定する常用標準品をいう。以下同じ。）適量を減圧下（0.67 kPa 以下），60°C で 3 時間乾燥した後，20 mg(力価)相当量を正確に量り 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に同溶媒を標線まで加えて標準原液を調製した（この液 1 mL は，サリノマイシンナトリウムとして 0.2 mg(力価)を含有する。）。

2) センデュラマイシンナトリウム標準原液

常用標準センデュラマイシン 20 mg(力価)相当量を正確に量り 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に同溶媒を標線まで加えて標準原液を調製した（この液 1 mL は，センデュラマイシンナトリウムとして 0.2 mg(力価)を含有する。）。

3) ナラシン標準原液

常用標準ナラシン 20 mg(力価)相当量を正確に量り 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に同溶媒を標線まで加えて標準原液を調製した（この液 1 mL は，ナラシンとして 0.2 mg(力価)を含有する。）。

4) モネンシンナトリウム標準原液

常用標準モネンシン 20 mg(力価)相当量を正確に量り 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に同溶媒を標線まで加えて標準原液を調製した（この液 1 mL は，モネンシンナトリウムとして 0.2 mg(力価)を含有する。）。

5) ラサロシドナトリウム標準原液

常用標準ラサロシド 20 mg(力価)相当量を正確に量り 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に同溶媒を標線まで加えて標準原液を調製した（この液 1 mL は，ラサロシドナトリウムとして 0.2 mg(力価)を含有する。）。

6) 混合標準液

使用に際して、サリノマイシンナトリウム標準原液、センデュラマイシンナトリウム標準原液、ナラシン標準原液、モネンシンナトリウム標準原液及びピラサロシドナトリウム標準原液の一定量を混合してメタノールで正確に希釈し、1 mL 中に各抗生物質としてそれぞれ 0.1, 0.125, 0.25, 0.5, 1 及び 2 µg(力価)を含有する各混合標準液を調製した。

7) アセトニトリル、メタノール及び蒸留水は、液体クロマトグラフ用を用いた。ヘキサン及び酢酸エチルは、残留農薬試験用を用いた。エタノールは、特級 99.5%を用いた。その他、特記している以外の試薬は、特級を用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ：島津製作所製 Prominence
- 2) 質量分析計：島津製作所製 LCMS-2010EV
- 3) マグネチックスターラー：柴田科学製 MU-4
- 4) ロータリーエバポレーター：東京理化学器械製 N-1N 型
- 5) 高速遠心分離器：日立製作所製 SCT15B
- 6) シリカゲルミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Silica (充てん剤量 690 mg) に 10 mL のリザーバーを連結したもの

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過した。ろ液 25 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40°C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

ヘキサン-酢酸エチル (9+1) 10 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

シリカゲルミニカラムをヘキサン 10 mL で洗浄し、あらかじめ硫酸ナトリウム (無水) 約 20 g を入れた漏斗をミニカラムのリザーバー部分の上に置いた。

試料溶液を漏斗に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下させた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-酢酸エチル (9+1) 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次漏斗に加え、同様に流下させた。更に漏斗中の硫酸ナトリウムをヘキサン-酢酸エチル (9+1) 5 mL で洗浄し、同様に流下させた後、漏斗をとりはずし、ヘキサン-酢酸エチル (9+1) 10 mL をミニカラムに加え、洗浄した。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-エタノール (4+1) 15 mL をミニカラムに加えて各抗生物質を溶出させた。溶出液を 40°C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

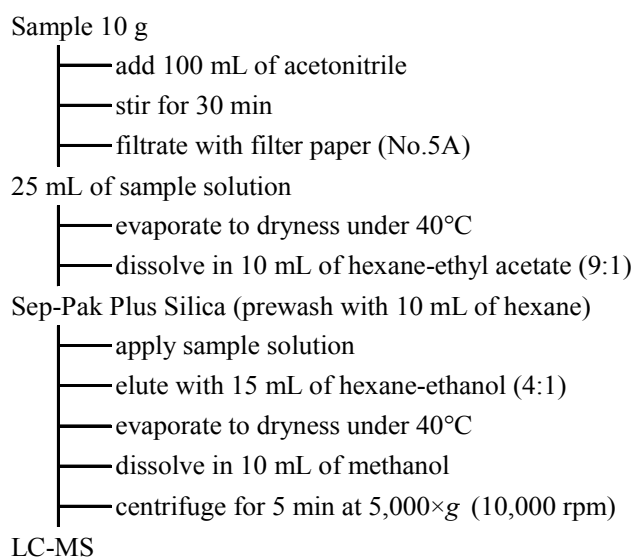
メタノール 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10,000 rpm (5,000×g) で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出 (SIM) クロマトグラムを作成し、ピーク面積又は高さより、試料中の各抗生物質量を算出

した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に、液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件を Table 2 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for polyether antibiotics in formula feed

Table 2 Operating conditions for LC-MS

Column	Phenomenex Gemini 5 μ C18 110 Å (2 mm i.d.×150 mm, 5 μ m)
Mobile phase	Acetonitrile-5 mmol/L ammonium acetate solution (4:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temp.	40°C
Injection volume	5 μ L
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N ₂ (1.5 L/min)
Heat block temp.	200°C
CDL temp.	250°C
Monitor ion	<i>m/z</i> 769 (salinomycin), 891 (semduramicin), 783 (narasin A), 688 (monensin A), 608 (lasalocid)

3 結果及び考察

3.1 質量分析計条件の検討

ポリエーテル系の抗生物質のイオン化法としてエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法の正イオンモードによるものが知られており^{18), 19)}, 本法もこのイオン化法を用いて検討した。

サリノマイシンナトリウム, センデュラマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウム各標準液について, 本法の測定条件によりスキャンモードで測定したところ, Fig. 1 に示す各マススペクトルが得られた。

各標準液のマススペクトルにおいて, 最も強度の大きいピークはそれぞれ, サリノマイシン, センデュラマイシン, ナラシン, モネンシン及びラサロシドで *m/z* 769, 891, 783, 688 及び 608 (すべてアンモニウム付加イオン [M+NH₄]⁺) であった。

よって、これらをモニターイオンとして採用することにした。

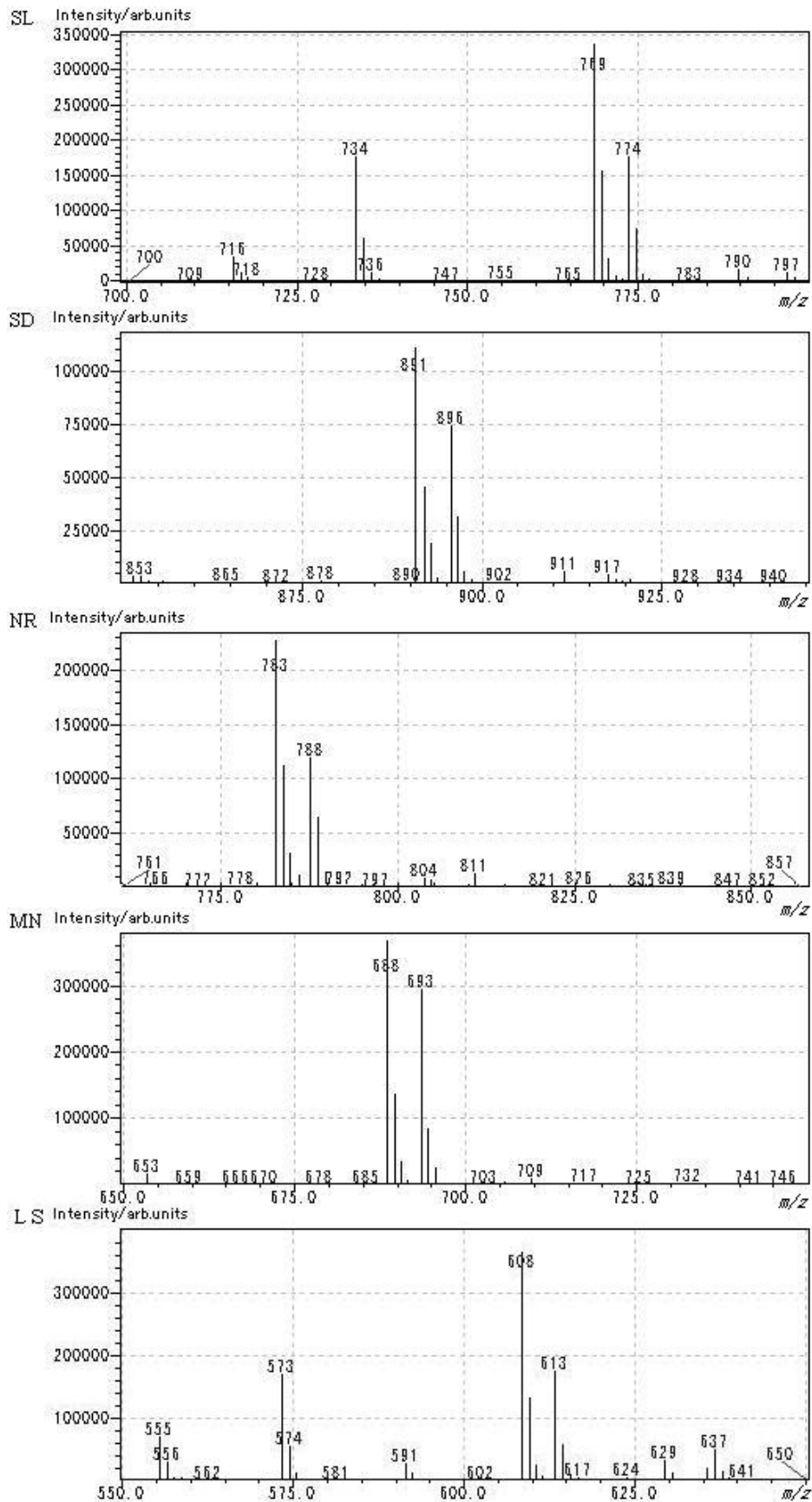


Fig. 1 Mass spectra of each standard solution

3.2 液体クロマトグラフィーの測定条件の検討

1) 酢酸アンモニウム溶液の影響の検討

飼料分析基準に記載されている配合飼料中のサリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン及びモネンシンナトリウムの液体クロマトグラフによる定量法¹¹⁾⁻¹⁴⁾では、溶離液にメタノール-水-酢酸(940+60+1)が使用されている。また、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた定量法では、酢酸アンモニウム溶液が多用されていることから、これらを考慮して、溶離液としてメタノール-水(9+1)とメタノール-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(9+1)を比較検討することにより、酢酸アンモニウム溶液の影響について検討した。

その結果、酢酸アンモニウム溶液を用いたものは用いなかった場合よりピーク形状は良好であったため、以後の検討では酢酸アンモニウム溶液を含む溶離液を使用することにした。

2) 保持時間及び付加イオンの検討

一般的に使用される有機溶媒としてメタノール及びアセトニトリルを、また酢酸アンモニウム溶液の濃度については5及び10 mmol/Lを用いて検討を行った。

まず、メタノールを用いて、メタノール-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(9+1)及びメタノール-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(9+1)を検討したところ、いずれもモニターイオンは異なるものの、モネンシンとセンデュラマイシンの保持時間がきわめて近接していた。

そこで、保持時間を遅くするため、酢酸アンモニウム溶液の溶離液中の組成比率を増加させ、メタノール-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(4+1)及びメタノール-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(4+1)を検討したが、この傾向は変わらなかった。

次に、アセトニトリルを用いて、アセトニトリル-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(9+1)及びアセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(9+1)を検討したところ、各抗生物質とも、メタノールを用いた場合よりも保持時間が早くなった。

そこで、保持時間を遅くするため、先と同様にしてアセトニトリル-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(4+1)及びアセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(4+1)を検討したところ、いずれもピークの分離状況及び保持時間において良好な結果が得られた。ここで、アセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(4+1)を用いた場合において、サリノマイシン、センデュラマイシン、ナラシン、モネンシン及びラサロシドのマススペクトルにおける最も強度の大きいピークの付加イオンが全てアンモニウムイオンであったことから、酢酸アンモニウム溶液の濃度は5 mmol/Lで十分と考えられ、本法では溶離液をアセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(4+1)とすることにした。

3.3 検量線の作成

2.2の6)に従って調製した混合標準液各5 µLを液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、得られたSIM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た。その結果、検量線はいずれも0.5~10 ng(力価)の範囲で直線性を示した。

3.4 ミニカラムの検討

2.2の6)に従って調製した混合標準液を、成鶏飼育用配合飼料に0.5 g(力価)/t相当量添加した試料(以下「予備検討用試料」という。)について、飼料分析基準に記載されているバイオオートグラフによる微量定量法¹⁷⁾に従って、試料液を調製し、これを適宜希釈した溶液を、3.1及び3.2で検討した条件にて、液体クロマトグラフ質量分析計に供試した。その結果、サリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナ

トリウムとしての回収率は、それぞれ 95.1, 121, 93.4, 102 及び 73.4%であり、比較的良好な結果が得られたため、この方法を基としてその後の検討を進めた。

しかし、バイオオートグラフによる微量定量法では、目的成分をクロロホルム-酢酸エチル (9+1) に転溶し、シリカゲルミニカラムに負荷後、同溶媒で洗浄、最後にクロロホルム-メタノール (4+1) で溶出させることにより精製を行っている。近年、環境への負荷軽減及び分析者の健康面への影響の観点より溶媒使用量の減少及び塩素系溶媒の使用を避けることが望まれていることから、基本的に溶媒使用量が半分になるように変更し、かつクロロホルムを使用しない方法を検討した。

1) 負荷・洗浄液の検討

試料として予備検討用試料を使用し、クロロホルム-酢酸エチル (9+1) に替わる溶媒として、ジエチルエーテル-酢酸エチル (9+1) とヘキサン-酢酸エチル (9+1) を検討した。

その結果、ジエチルエーテル-酢酸エチル (9+1) を用いた場合は、目的成分がシリカゲルミニカラムに吸着せず、負荷後すぐに流出したが、ヘキサン-酢酸エチル (9+1) を用いた場合には、洗浄液として 10 mL 加えた後、更に 15 mL 加えても、目的成分は流出せず、カラムに保持できた。このことから、クロロホルム-酢酸エチル (9+1) に替えて、ヘキサン-酢酸エチル (9+1) を採用することにした。

2) 溶出溶媒の検討

試料として予備検討用試料を使用し、クロロホルム-メタノール (4+1) に替わる溶出溶媒を検討したところ、Table 3 の結果が得られた。

この結果からヘキサン-エタノールを使用した場合、良好な結果が得られる傾向があった。

ここで極性溶媒であるエタノールの量が少ないと目的成分の溶出が不十分になり、多すぎると妨害成分も溶出してくる可能性が考えられたことから、ヘキサン-エタノール (4+1) を溶出溶媒として採用することにした。

Table 3 Influence of eluent compositions on recoveries

Eluent	Amount of eluent (mL)	Kind of polyether antibiotics				
		LS	SD	MN	SL	NR
Hexane-ethyl acetate (9:1)	15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hexane-ethyl acetate (4:1)	15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hexane-acetone (9:1)	15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hexane-acetone (4:1)	15	29.3	0.0	79.0	9.4	0.0
Hexane-acetone (1:1)	15	63.5	74.8	84.6	82.5	55.9
Hexane-ethanol (9:1)	15	106.8	73.1	89.2	91.8	93.9
Hexane-ethanol (4:1)	15	86.3	76.3	88.2	91.3	94.9
Hexane-ethanol (1:1)	15	74.3	76.7	86.0	89.9	93.0

3) 溶出液量の検討

シリカゲルミニカラムからの溶出溶媒としてヘキサン-エタノール (4+1) を採用することとし、次に溶出液量の検討を行うため、試料として予備検討用試料を使用し、シリカゲルミニカラムからの溶出液を 3 mL ごとに分画し、各溶出画分について本法に従って測定し回収率を

求めた。

その結果は Table 4 のとおりであり、サリノマイシン、センデュラマイシン、ナラシン及びモネンシンについては溶出液量が 0~6 mL で溶出しているが、ラサロシドについては 0~12 mL で溶出していたことから、余裕をみて溶出液量は 15 mL とすることにした。

Table 4 Elution pattern from silica-gel mini column

Fraction volume (mL)	Kind of polyether antibiotics					(Recovery: %)
	LS	SD	MN	SL	NR	
0 ~ 3	81.1	55.7	91.0	87.1	82.8	
3 ~ 6	5.8	38.2	4.8	1.7	1.5	
6 ~ 9	1.0	0	0	0	0	
9 ~ 12	0.03 ^{a)}	0	0	0	0	
12 ~ 15	0	0	0	0	0	
15 ~ 18	0	0	0	0	0	
18 ~ 21	0	0	0	0	0	
21 ~ 24	0	0	0	0	0	
24 ~ 27	0	0	0	0	0	
27 ~ 30	0	0	0	0	0	

a) Trace

3.5 試料採取量の検討

2.1 で調製した試料のうち、肉用牛肥育用配合飼料にサリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムとして 0.5 g(力価)/t 相当量添加した試料について、それぞれ 5.0, 7.5, 10, 15 及び 20 g を採取し、以下本法に従って回収率を求め、試料採取量の検討を行った。

その結果は Table 5 のとおり 5~20 g の範囲で概ね良好な回収率を得ることができたため、本法ではその中央値である 10 g を採取量とすることにした。

Table 5 Comparison of the effect of different sample weight

	Sample weight					(Recovery: %)
	5.0 g	7.5 g	10 g	15 g	20 g	
LS	93.1	95.4	90.5	94.0	88.5	
SD	108.8	107.7	93.0	101.7	101.9	
MN	107.8	103.2	103.9	101.0	100.8	
SL	104.5	100.0	91.2	97.3	94.5	
NR	92.6	107.5	95.7	86.5	90.5	

3.6 妨害物質の検討

現在、サリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウム以外に飼料添加物に指定されている抗生物質は 14 種類 (亜

鉛バシトラシン、アビラマイシン、エフロトマイシン、エンラマイシン、アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、セデカマイシン、DESTOマイシン A、ノシヘプタイド、バージニアマイシン、ビコザマイシン、フラボフォスフォルポール、硫酸コリスチン及びリン酸タイロシン)、また合成抗菌剤は7種類(アンプロリウム、エトパベート、クエン酸モランテル、スルファキノキサリン、デコキネート、ナイカルバジン及びハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウム)ある²⁾。

これらの標準品を各々最適な溶媒に溶解した後、メタノールを用いて調製した標準液を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

また、市販の配合飼料(成鶏飼育用(3種類)、肉豚肥育用、ほ乳期子牛育成用、幼令肉用牛育成用、肉用牛肥育用(2種類)及び乳用牛飼育用)を用い、本法により調製した試料溶液を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

なお、妨害物質の検討で得られたSIMクロマトグラムの一例をFig. 2に示した。

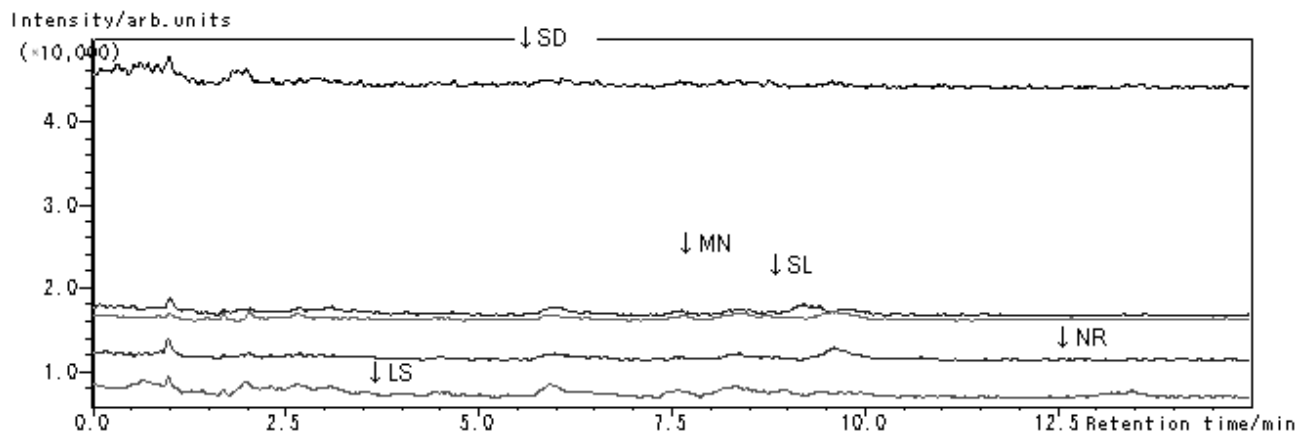


Fig. 2 SIM chromatograms of sample solution of typical formula feed for layer (not spiked)
LC-MS conditions are shown in Table 2.

3.7 添加回収試験及び検出下限

2.1で調製した0.5及び5 g(力価)/tを添加した試料(配合飼料3種類)を用い、本法により3回繰り返し定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は、Table 6のとおり、サリノマイシンナトリウムについては、平均回収率89.7~98.8%、その繰返し精度は、相対標準偏差(RSD)として2.9%以下、センデュラマイシンナトリウムについては、平均回収率80.0~90.0%、その繰返し精度は、RSDとして10%以下、ナラシンについては、平均回収率83.0~89.7%、その繰返し精度は、RSDとして13%以下、モネンシンナトリウムについては、平均回収率104~109%、その繰返し精度は、RSDとして1.5%以下、ラサロシドナトリウムについては、平均回収率85.2~94.5%、その繰返し精度は、RSDとして4.5%以下の成績が得られた。なお、添加回収試験で得られたSIMクロマトグラムの一例をFig. 3に示した。

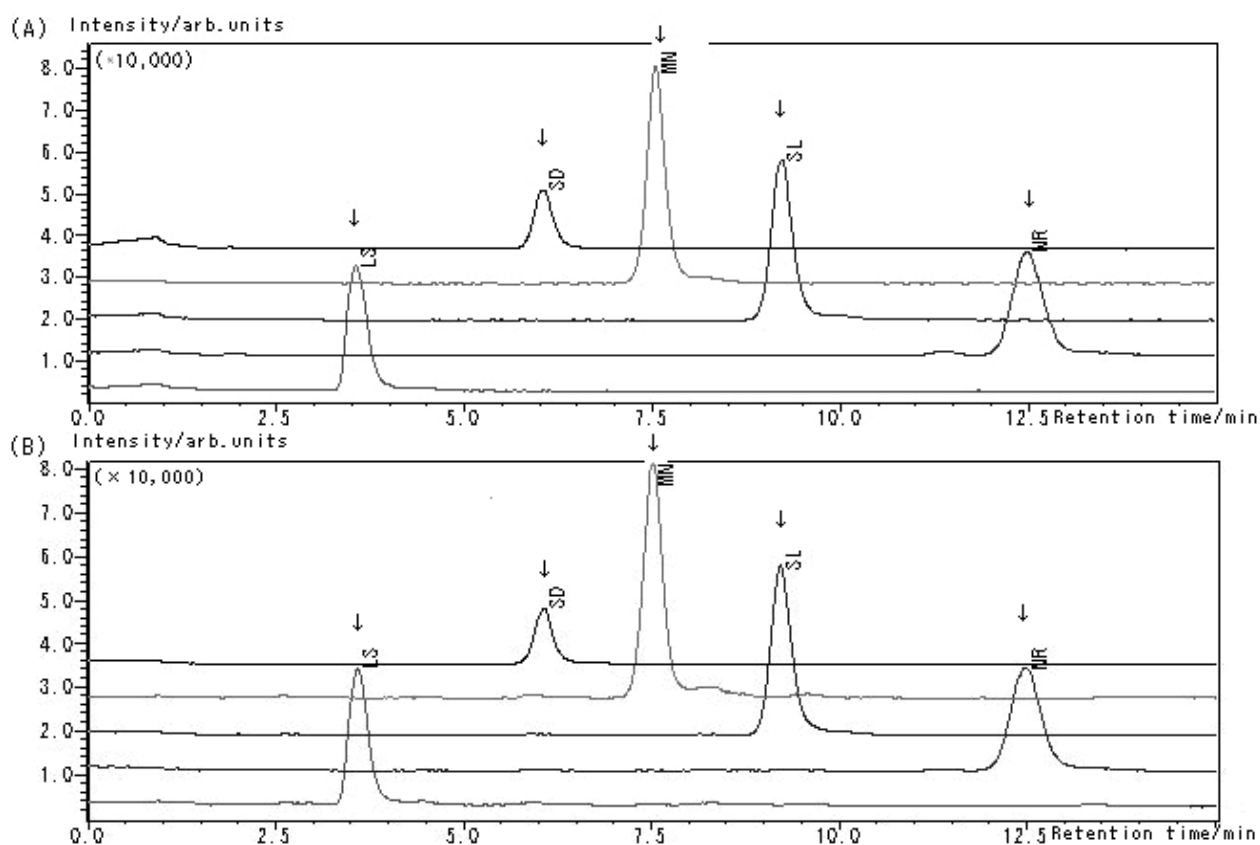
以上の結果から、本法は、既存のバイオオートグラフ法の検出下限である試料中0.5 g(力価)/t相当量を検出可能であると考えられた。

Table 6 Recovery tests in formula feeds

Added level (g(potency)/ton)	Kind of antibiotic	Kind of formula feeds (%)					
		for layer		for finishing pig		for beef cattle	
		Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
5	LS	91.6	(2.8)	91.4	(1.4)	85.2	(3.8)
	SD	89.5	(0.7)	84.6	(0.9)	88.7	(1.4)
	MN	104	(1.5)	105	(0.8)	108	(1.1)
	SL	96.2	(1.9)	98.4	(2.0)	98.8	(1.3)
	NR	86.8	(1.6)	88.3	(2.3)	89.7	(3.6)
0.5	LS	94.5	(2.1)	86.0	(4.5)	89.4	(2.1)
	SD	89.4	(1.2)	80.0	(10)	90.0	(3.9)
	MN	109	(1.1)	104	(0.9)	104	(0.5)
	SL	95.0	(2.4)	95.5	(2.3)	89.7	(2.9)
	NR	88.9	(7.6)	83.0	(6.6)	83.4	(13)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation

**Fig. 3 SIM chromatograms of standard solution and sample solution**

LC-MS conditions are shown in Table 2.

(A) Mixed standard solution (The amount of each antibiotics are 0.6 ng(potency))

(B) Sample solution of formula feed for layer (added each antibiotics at 0.5 g(potency)/t)

3.8 共同試験

本法の再現精度を調査するため、成鶏飼育用配合飼料にサリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムとして各 0.5 g(力価)/t 相当量を添加した共通試料を用いて、株式会社島津製作所分析計測事業部応用技術部、アジレント・テクノロジー株式会社アプリケーションセンター、全国酪農業協同組合連合会分析センター、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、同仙台センター及び同神戸センター大阪事務所（8 試験室）において、本法に従って共同分析を実施した。

その結果、Table 7 のとおり、成鶏飼育用配合飼料中のサリノマイシンナトリウムの平均回収率は 95.0%，その繰返し精度及び室間再現精度は、相対標準偏差（ RSD_r 及び RSD_R ）としてそれぞれ 2.7%及び 6.4%であり、HorRat は 0.36 であった。センデュラマイシンナトリウムの平均回収率は 98.6%，その繰返し精度及び室間再現精度は、 RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 2.6%及び 8.0%であり、HorRat は 0.45 であった。ナラシンの平均回収率は 88.5%，その繰返し精度及び室間再現精度は、 RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 3.5%及び 5.7%であり、HorRat は 0.31 であった。モネンシンナトリウムの平均回収率は 101%，その繰返し精度及び室間再現精度は、 RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 3.6%及び 5.0%であり、HorRat は 0.28 であった。ラサロシドナトリウムの平均回収率は 93.3%，その繰返し精度及び室間再現精度は、 RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 3.8%及び 8.2%であり、HorRat は 0.46 であった。

ここで、HorRat がすべて 0.5 を下回っていることについては、本法は飼料分析基準に収載されているバイオオートグラフによる微生物学的定量法を基に検討したことから、本法が既存の定量法と類似した分析操作になっており、各試験室が操作に習熟していることが原因の一つと考えられた。

なお、参考のため、各試験室で使用した LC-MS の機種等を Table 8 に示した。

Table 7 Collaborative study results

Lab. No.	(μg/kg)					
	SL ^{a)}		SD ^{a)}		NR ^{a)}	
1	532	486	465	426	465	468
2	480	480	489	488	464	482
3	437	425	504	491	415	444
4	497	499	530	518	439	441
5	511	504	441	427	460	426
6	467	477	487	479	436	462
7	449	442	529	550	394	406
8	461	451	534	527	425	451
Mean value ^{b)} (μg/kg)	475		493		442	
Recovery ^{b)} (%)	95.0		98.6		88.5	
RSD _r ^{c)} (%)	2.7		2.6		3.5	
RSD _R ^{d)} (%)	6.4		8.0		5.7	
HorRat	0.36		0.45		0.31	

Lab. No.	MN ^{a)}			
	MN ^{a)}		LS ^{a)}	
1	510	522	504	466
2	500	556	478	496
3	501	485	409	401
4	530	533	487	458
5	524	490	451	402
6	501	491	476	470
7	506	504	523	516
8	477	452	464	466
Mean value ^{b)} (μg/kg)	505		467	
Recovery ^{b)} (%)	101		93.3	
RSD _r ^{c)} (%)	3.6		3.8	
RSD _R ^{d)} (%)	5.0		8.2	
HorRat	0.28		0.46	

a) Added at 500 μg/kg

b) n=16

c) Relative standard deviation of repeatability

d) Relative standard deviation of reproducibility between different laboratories

Table 8 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	Instrument	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 5 μm)
2	Waters micromass Quattro Micro	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 3.5 μm)
3	Waters micromass Quattro Micro	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP Aqua (2.0×150 mm, 5 μm)
4	Shimadzu LCMS-2010EV	Phenomenex Gemini 5 μ C18 110 Å (2.0×150 mm, 5 μm)
5	Agilent Technologies Agilent 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)
6	Agilent Technologies Agilent 1100Series LC/MSD	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (2.0×50 mm, 3 μm)
7	Shimadzu LCMS-2010EV	Phenomenex Gemini 5 μ C18 110 Å (2.0×150 mm, 5 μm)
8	Agilent Technologies Agilent 6140	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 3.5 μm)

4 まとめ

配合飼料中に残留しているサリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びブラサロシドナトリウムの一斉微量定量法について、液体クロマトグラフ質量分析法を検討したところ、次の結果が得られた。

- 1) イオン化法としてエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード), モニターイオンとして, サリノマイシン, センデュラマイシン, ナラシン, モネンシン及びブラサロシドについて, それぞれ m/z 769, 891, 783, 688 及び 608 (すべてアンモニウム付加イオン $[M+NH_4]^+$) を適用したところ良好に測定が可能であった。
- 2) 溶離液としてアセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (4+1) を適用したところ良好に測定が可能であった。
- 3) 検量線は 0.5~10 ng(力価)の範囲で直線性を示した。
- 4) シリカゲルミニカラムを用いて精製を行う場合の洗浄液にヘキサン-酢酸エチル (9+1), 溶出液にヘキサン-エタノール (4+1) 15 mL を用いたところ良好に測定が可能であった。
- 5) 試料採取量は, 検討の結果 10.0 g を採用することにした。
- 6) 現在, サリノマイシンナトリウム, センデュラマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びブラサロシドナトリウム以外に飼料添加物に指定されている抗生物質 14 種類及び合成抗菌剤 7 種類並びに配合飼料 9 種類について, 定量を妨げるピークの有無を確認したところ, 妨害ピークは認められなかった。
- 7) 本法による添加回収試験を実施した結果, サリノマイシンナトリウムについては, 平均回収率 89.7~98.8%, その繰返し精度は, 相対標準偏差 (RSD) として 2.9%以下, センデュラマイシンナトリウムについては, 平均回収率 80.0~90.0%, その繰返し精度は, RSD として 10%以下, ナラシンについては, 平均回収率 83.0~89.7%, その繰返し精度は, RSD として 13%以下, モネンシンナ

トリウムについては、平均回収率 104~109%、その繰返し精度は、RSD として 1.5%以下、ラサロシドナトリウムについては、平均回収率 85.2~94.5%、その繰返し精度は、RSD として 4.5%以下の成績が得られた。

- 8) 本法により、配合飼料中に残留したサリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムについて、それぞれ 0.5 g(力価)/t 相当量を検出可能であった。
- 9) 成鶏飼育用配合飼料にサリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムとして各 0.5 g(力価)/t 相当量を添加した共通試料を用いて、8 試験室で共同分析を実施した。

その結果、成鶏飼育用配合飼料のサリノマイシンナトリウムの平均回収率は 95.0%、その繰返し精度及び室間再現精度は、相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) としてそれぞれ 2.7%及び 6.4%であり、HorRat は 0.36 であった。センデュラマイシンナトリウムの平均回収率は 98.6%、その繰返し精度及び室間再現精度は、 RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 2.6%及び 8.0%であり、HorRat は 0.45 であった。ナラシンの平均回収率は 88.5%、その繰返し精度及び室間再現精度は、 RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 3.5%及び 5.7%であり、HorRat は 0.31 であった。モネンシンナトリウムの平均回収率は 101%、その繰返し精度及び室間再現精度は、 RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 3.6%及び 5.0%であり、HorRat は 0.28 であった。ラサロシドナトリウムの平均回収率は 93.3%、その繰返し精度及び室間再現精度は、 RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 3.8%及び 8.2%であり、HorRat は 0.46 であった。

なお、本法は、平成 20 年 4 月 1 日付けで制定された飼料分析基準¹⁶⁾に収載された。

謝 辞

試験に際し、助言いただいた株式会社島津製作所分析計測事業部応用技術部京都カスタマーサポートセンターLC-MS 担当村田英明氏に感謝の意を表します。

また、共同試験に参加して頂いた株式会社島津製作所、アジレント・テクノロジー株式会社、全国酪農業協同組合連合会、社団法人日本科学飼料協会及び財団法人日本食品分析センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 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，告示第 750 号 (1976).
- 2) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，省令第 35 号 (1976).
- 3) 安倍豊子，河野敏威：飼料研究報告，6，122 (1980).
- 4) 草間豊子，寫田秀一：飼料研究報告，11，124 (1986).
- 5) 山谷昭一：飼料研究報告，19，155 (1994).
- 6) 千原哲夫：飼料研究報告，27，80 (2002).
- 7) 安倍豊子，河野敏威：飼料研究報告，6，114 (1980).
- 8) 草間豊子：飼料研究報告，11，107 (1986).
- 9) 菅野 清：畜産の研究，37，5，8 (1983).

- 10) 白戸綾子, 小山敬之: 飼料研究報告, **16**, 172 (1991).
- 11) 早川俊明, 舟津正人: 飼料研究報告, **26**, 51 (2001).
- 12) 小林郁美: 飼料研究報告, **27**, 71 (2002).
- 13) 千原哲夫: 飼料研究報告, **27**, 94 (2002).
- 14) 早川俊明, 牧野大作: 飼料研究報告, **26**, 60 (2001).
- 15) 小野雄造, 野口 淳: 飼料研究報告, **24**, 91 (1999).
- 16) 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).
- 17) 小山敬之: 飼料研究報告, **17**, 96 (1992).
- 18) Blanchflower W. J., Kennedy D. G.: J. Chromatogr. B, **675**, 225 (1996).
- 19) Turnipseed S. B., Roybal J. E., Pfenning A. P.: J. of AOAC Int., **84**, 640 (2001).