

技術レポート**1 ポリエーテル系抗生物質の定量に用いる塩基性アルミナの検討**千原 哲夫^{*1}, 橋本 仁康^{*2}, 進藤 富枝^{*3}**1 緒 言**

飼料分析基準¹⁾に記載されたポリエーテル系抗生物質の微生物学的定量法^{2)~7)}で用いるカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナは、サリノマイシンナトリウム (SL) 及びモネンシンナトリウム (MN) では Alcoa 製の Activated Aluminas F-20 又はこれと同等のもの、ナラシン (NR) では Alcoa Industrial Chemicals 製の Activated Aluminas CG-20 又はこれと同等のもの(粒径はいずれも 74~177 μm (200~80 メッシュ)) を用いることが注記されている。なお、Activated Aluminas CG-20 は Activated Aluminas F-20 を精製したものであり、Activated Aluminas CG-20 が流通してからは、Activated Aluminas F-20 の入手が困難になったことから、Activated Aluminas CG-20 を Activated Aluminas F-20 の同等品として扱ってきた。

平成 18 年 7 月時点での調査では、上記の 2 種類の塩基性アルミナは、一般に流通しておらず、また Alcoa Industrial Chemicals は塩基性アルミナの製造を停止し、Almatis AC, 更に Engelhard がその製造を引き継いだとの情報が得られた。

各試験室内の Activated Aluminas CG-20 の在庫が尽きた場合に、微生物学的定量法によるポリエーテル系抗生物質の定量に支障を来すことが考えられるために、今回、現在流通しているカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナを調査、検討し、これらの代替となる同等品としての知見を得たので、その概要を報告する。

2 実験方法**2.1 試 料**

抗菌性物質を含まない市販の中すう育成用配合飼料及び肉用牛肥育用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、供試試料とした。

各配合飼料の配合割合は、表 1 のとおりである。

なお、サリノマイシンナトリウム及びナラシンでは中すう育成用配合飼料、モネンシンナトリウムでは肉用牛肥育用配合飼料を用いた。

^{*1} 独立行政法人肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター名古屋センター

^{*2} (独) 肥飼料検査所本部, 現 (独) 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

^{*3} (独) 農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

表 1 配合飼料の配合割合

飼料の種類	原材料の区分	割合 (%)	原材料名
中すう育成用	穀 類	69	とうもろこし
	植物性油かす類	13	大豆油かす
	そ う こ う 類	7	米ぬか
	動物質性飼料	5	魚粉
	そ の 他	6	アルファルファ, リン酸カルシウム, 炭酸カルシウム, 食塩, 飼料添加物
肉用牛肥育用	穀 類	59	とうもろこし, 大麦, マイロ
	そ う こ う 類	35	ふすま, コーングルテンフィード
	植物性油かす類	5	大豆油かす
	そ の 他	1	炭酸カルシウム, 食塩, 飼料添加物

2.2 試 薬

1) サリノマイシンナトリウム標準液

常用標準サリノマイシン適量を減圧下 (0.67 kPa 以下), 60°C で 3 時間乾燥した後, 20 mg(力価)相当量を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてサリノマイシンナトリウム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.) .

使用に際して, 標準原液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に 10 µg(力価)を含有するサリノマイシンナトリウム標準液を調製した.

2) ナラシン標準液

常用標準ナラシン 20 mg(力価)相当量を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてナラシン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.) .

使用に際して, 標準原液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に 8 µg(力価)を含有するナラシン標準液を調製した.

3) モネンシンナトリウム標準液

常用標準モネンシン 20 mg(力価)相当量を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてモネンシンナトリウム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.) .

使用に際して, 標準原液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に 6 µg(力価)を含有するモネンシンナトリウム標準液を調製した.

4) カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ

比較試験を行った塩基性アルミナは, 表 2 のとおりである.

表 2 塩基性アルミナの種類

製品名	粒度	製造番号	製造（販売）業者
① Activated Aluminas CG-20	80-200 mesh	A1-192	Alcoa Industrial Chemicals
② Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	80-200 mesh	P567098	GFS Chemicals
③ Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	80-200 mesh	P672606	GFS Chemicals
④ Chromatographic alumina CG-20	80-200 mesh	803-04	Engelhard
⑤ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	70-230 mesh	TA1237076	Merck
⑥ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	70-230 mesh	TA1306676	Merck
⑦ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	70-230 mesh	TA1326276	Merck
⑧ Aluminum oxide Type F-20	80-200 mesh	112K0955	Sigma-Aldrich
⑨ Alumina, Activated, Basic Brockmann I	40-200 mesh	L137915	GFS Chemicals

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ

溶離液用ポンプ：島津製作所製 LC-9AD
 オートサンプラー：日本分光製 AS-950
 紫外可視吸光光度検出器：島津製作所製 SPD-10AV
 反応液用ポンプ：島津製作所製 LC-9AD
 反応槽：島津製作所製 CRB-6A
 カラム恒温槽：島津製作所製 CTO-6A
 データ処理機：島津製作所製 C-R6A

2) マグネチックスターラー：柴田科学製 MU-4

2.4 定量方法

1) 抽出

試料（サリノマイシンナトリウム及びナラシンでは中さう育成用配合飼料，モネンシンナトリウムでは肉用牛肥育用配合飼料）10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ，標準液 100 mL を加え，マグネチックスターラーで 20 分間かき混ぜた後，ろ紙（5 種 A）でろ過し，カラムクロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

2) カラムクロマトグラフィー

カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ 12 g をカラム管（内径 14 mm）に乾式で充てんし，クリーンアップ用カラムを調製した。試料溶液をカラムに入れ，流出液 5 mL 毎の画分を採取し，液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び標準液 20 μ L 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

検出器：紫外可視吸光光度検出器（測定波長：520 nm）
 カラム：Shim-pack VP-ODS（内径 4.6 mm，長さ 150 mm，粒径 5 μ m）
 溶離液：メタノール-水-酢酸（94+6+0.1）
 反応液：硫酸 10 mL をメタノール 475 mL にかき混ぜながら徐々に加えた後，バニリン 15 g を加えて溶かす（用時調製）。

流 速：溶離液 0.6 mL/min, 反応液 0.6 mL/min

カラム槽温度：40°C

反応槽温度：95°C

4) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク面積を求め、各標準液におけるピーク面積に対する各試料液におけるピーク面積の比を求め、各抗生物質の回収率として算出した。

3 結果及び考察

3.1 液体クロマトグラフィーによる回収率の確認

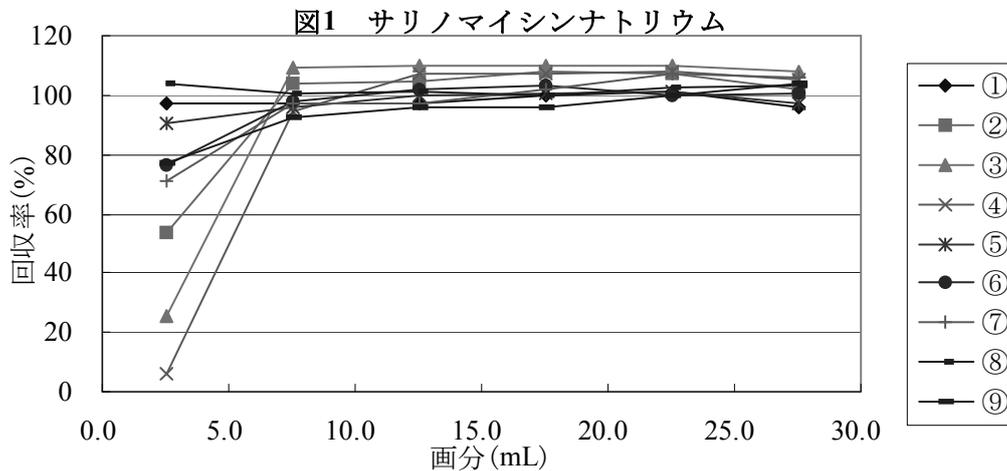
1) サリノマイシンナトリウムについて

中さう育成用配合飼料にサリノマイシンナトリウム標準液（10 µg(力価)/mL）を添加した試料液を表3の①から⑨の各カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナに入れ、各流出画分を採取し、サリノマイシンナトリウムの回収率を求めたところ、表3、図1の結果となった。

通常使用してきた①のカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナと同等の挙動を示すものとしては⑤及び⑧があり、0~5 mLの画分で吸着が認められたが、10 mL以降の画分ではほぼ同等の挙動を示すものとして⑥、⑦及び⑨があった。また複数のロットが入手可能であった②及び③並びに⑤、⑥及び⑦ではロット差が認められた。

表3 サリノマイシンナトリウム
 中すう育成用配合飼料：10 µg(力価)/mL

製品名	製造番号	流出画分 (mL)						回収率：%
		~5	~10	~15	~20	~25	~30	
① Activated Aluminas CG-20	A1-192	97	97	97	100	101	96	
② Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	803-04	53	104	105	108	107	102	
③ Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	P567098	25	109	110	110	110	108	
④ Chromatographic alumina CG-20	P672606	6	95	107	108	108	105	
⑤ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	L137915	91	96	100	101	101	97	
⑥ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	TA1237076	76	98	102	103	100	101	
⑦ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	TA1306676	71	97	98	102	107	106	
⑧ Aluminum oxide Type F-20	TA1326276	104	100	101	100	103	103	
⑨ Alumina, Activated, Basic Brockmann I	112K0955	77	92	96	96	100	104	



2) ナラシン

中すう育成用配合飼料にナラシン標準液（8 µg(力価)/mL）を添加した試料液を表3の①から⑨の各カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナに入れ、各流出画分を採取し、ナラシンの回収率を求めたところ、表4、図2の結果となった。

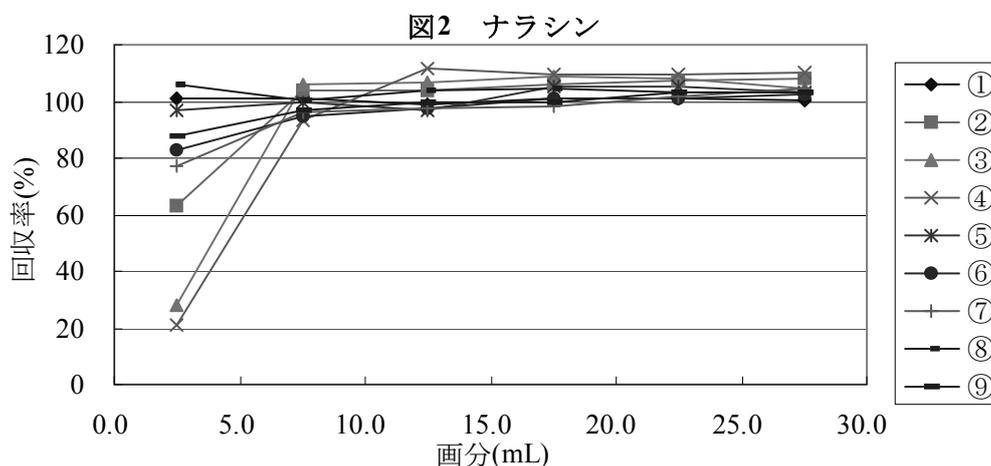
通常使用してきた①のカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナと同等の挙動を示すものとしては⑤及び⑧があり、0~5 mLの画分で吸着が認められたが、10 mL以降の画分ではほぼ同等の挙動を示すものとして⑥、⑦及び⑨があった。また複数のロットが入手可能であった②及び③並びに⑤、⑥及び⑦ではロット差が認められた。

表4 ナラシン

中すう育成用配合飼料：8 µg(力価)/mL

回収率：%

製品名	製造番号	流出画分 (mL)					
		~5	~10	~15	~20	~25	~30
① Activated Aluminas CG-20	A1-192	101	101	99	101	101	101
② Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	803-04	63	104	104	106	107	108
③ Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	P567098	28	106	107	109	108	105
④ Chromatographic alumina CG-20	P672606	21	93	112	110	109	110
⑤ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	L137915	97	100	97	105	105	103
⑥ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	TA1237076	83	95	97	101	101	102
⑦ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	TA1306676	77	96	98	98	102	105
⑧ Aluminum oxide Type F-20	TA1326276	106	100	104	104	103	103
⑨ Alumina, Activated, Basic Brockmann I	112K0955	88	97	100	100	103	103



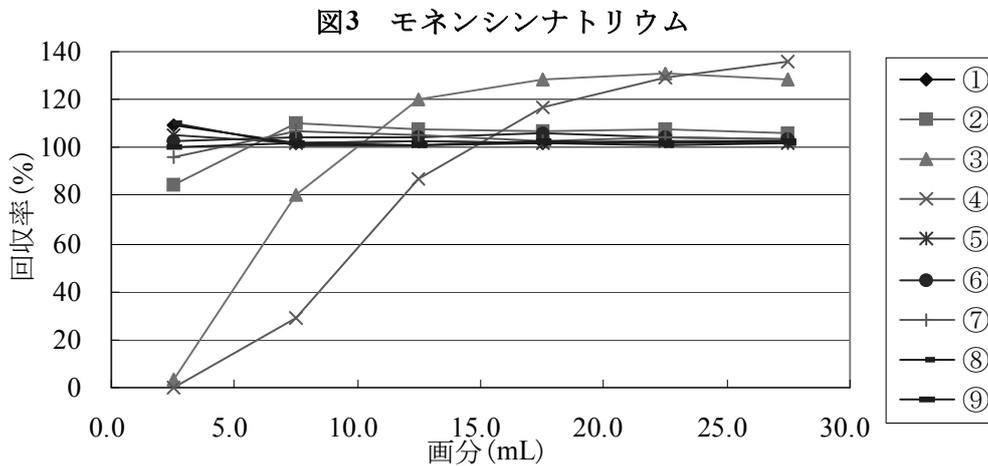
3) モネンシナトリウム

肉用牛肥育用配合飼料にモネンシナトリウム標準液 (6 µg(力価)/mL) を添加した試料液を表3の①から⑨の各カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナに入れ、各流出画分を採取し、モネンシナトリウムの回収率を求めたところ、表5、図3の結果となった。

通常使用してきた①のカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナと同等の挙動を示すものとしては⑤、⑥、⑧及び⑨があり、0~5 mLの画分で吸着が認められたが、10 mL以降の画分でほぼ同等の挙動を示すものとして⑦があった。また複数のロットが入手可能であった②及び③並びに⑤、⑥及び⑦ではロット差が認められた。

表5 モネンシンナトリウム
肉用牛肥育用配合飼料：6 µg(力価)/mL

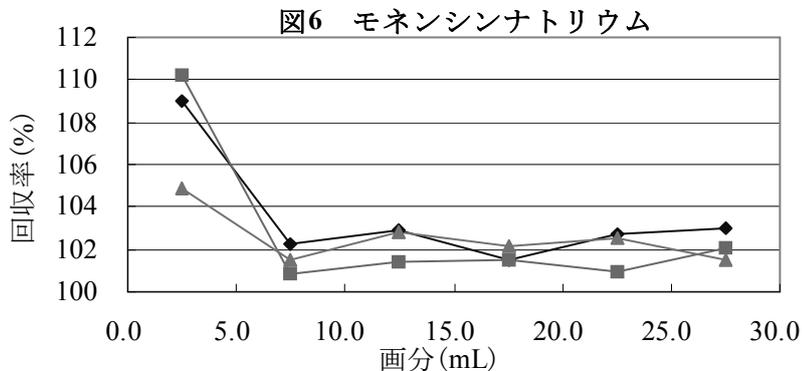
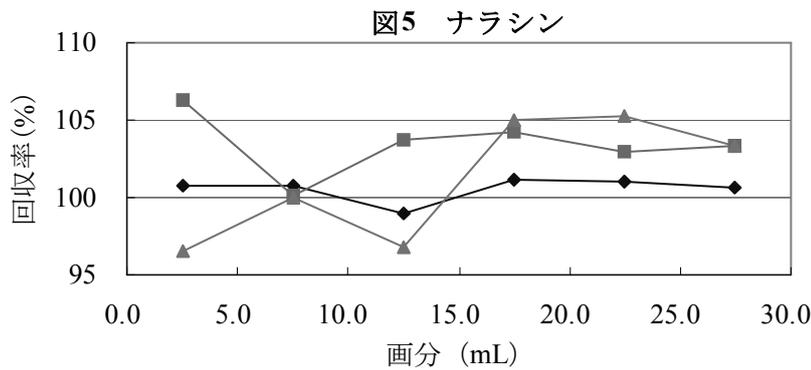
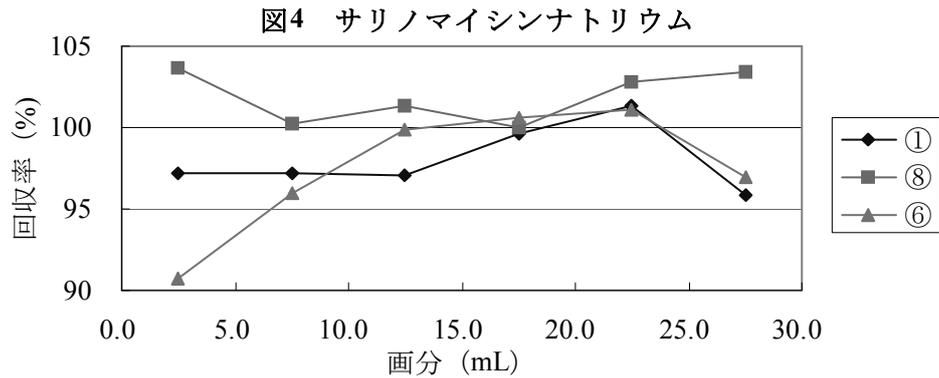
製品名	製造番号	流出画分 (mL)						回収率：%
		~5	~10	~15	~20	~25	~30	
① Activated Aluminas CG-20	A1-192	109	102	103	102	103	103	
② Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	803-04	85	110	108	107	108	106	
③ Alumina Activated #670 Alcoa #CG20	P567098	3	81	120	128	131	128	
④ Chromatographic alumina CG-20	P672606	0	29	87	117	130	136	
⑤ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	L137915	105	101	103	102	103	102	
⑥ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	TA1237076	102	104	105	106	105	103	
⑦ Aluminium Oxide 90 Active Basic Art.1076	TA1306676	96	107	105	103	105	103	
⑧ Aluminum oxide Type F-20	TA1326276	110	101	101	101	101	102	
⑨ Alumina, Activated, Basic Brockmann I	112K0955	100	102	101	102	102	103	



3.2 Activated Aluminas CG-20 の同等品について

3.1 の 1)~3)の試験結果から、また図 4~6 のとおり、3 種類のポリエーテル系抗生物質の定量で用いるカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ①Activated Aluminas CG-20 (Alcoa Industrial Chemicals 製) の同等品として、⑥Aluminium Oxide 90 Active Basic Art. 1076 (Merck 製) 及び⑧Aluminum oxide Type F-20 (Sigma-Aldrich 製) が比較的良好と判断できた。

しかし、⑥Aluminium Oxide 90 Active Basic Art. 1076 は、粒度が 70-230 mesh と①Activated Aluminas CG-20 の 80-200 mesh と異なり、また多数のロットが流通しており、ロット差も認められたことから、同等品として扱うには問題があると判断した。また、⑧Aluminum oxide Type F-20 は、粒度が 80-200 mesh と①Activated Aluminas CG-20 と同じであったことから、今後はこれを同等品として扱って問題ないと判断した。



3.3 微生物学的定量法による回収率の確認

1) サリノマイシンナトリウム

サリノマイシンが 50 mg(力価)/トン添加された市販の中さう育成用配合飼料及び幼中さう育成用配合飼料について、①Activated Aluminas CG-20 及び⑧Aluminum oxide Type F-20 を用いて微生物学的定量法（飼料分析基準 10.12.1 の(2)）により定量し、得られた表示量に対する回収率を比較した。

その結果、表 6 のとおり、回収率に顕著な差は認められなかった。

2) ナラシン

ナラシンが 80 mg(力価)/トン添加された市販の 2 種類のブロイラー肥育前期用配合飼料について、①Activated Aluminas CG-20 及び⑧Aluminum oxide Type F-20 を用いて微生物学的定量法

(飼料分析基準 10.31.1 の(2)) により定量し、得られた表示量に対する回収率を比較した。

その結果、表 6 のとおり、回収率に顕著な差は認められなかった。

3) モネンシンナトリウム

モネンシンナトリウムが 30 mg(力価)/トン添加された市販の 2 種類の肉用牛肥育用配合飼料について、①Activated Aluminas CG-20 及び⑧Aluminum oxide Type F-20 を用いて微生物学的定量法 (飼料分析基準 10.25.1 の(3)) により定量し、得られた表示量に対する回収率を比較した。その結果、表 6 のとおり、回収率に顕著な差は認められなかった。

表 6 微生物学的定量法による回収率

抗生物質名	飼料の種類	回収率：% (n=2)	
		①Activated Aluminas CG-20	⑧Aluminum oxide Type F-20
サリノマイシン ナトリウム	中すう育成用	117	121
	幼中すう育成用	100	96
ナラシン	ブロイラー肥育前期用	103	103
	ブロイラー肥育前期用	112	111
モネンシンナト リウム	肉用牛肥育用	112	113
	肉用牛肥育用	103	107

4 まとめ

ポリエーテル系抗生物質の微生物学的定量法で用いるカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナの同等品について検討したところ、飼料分析基準に規定された Activated Aluminas F-20 (Alcoa 製) 及び Activated Aluminas CG-20 (Alcoa Industrial Chemicals 製) の同等品として、Aluminum oxide Type F-20 (Sigma-Aldrich 製) が適当と考えられた。

文 献

- 1) 農林水産省生産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 2) 小山敬之：飼料研究報告，6，163 (1980).
- 3) 安倍豊子，河野敏威：飼料研究報告，6，122 (1980).
- 4) 草間豊子：飼料研究報告，11，124 (1986).
- 5) 安倍豊子，河野敏威：飼料研究報告，6，114 (1980).
- 6) 草間豊子：飼料研究報告，11，107 (1986).
- 7) 千原哲夫：飼料研究報告，27，80 (2002).