

## 2 配合飼料中のクエン酸モランテルの液体クロマトグラフによる定量法の改良

野村 昌代\*

### Improved Determination Method of Morantel Citrate in Formula Feeds by LC

Masayo NOMURA\*

(\*Food and Agricultural Materials Inspection Center,  
Fertilizer and Feed Inspection Department)

An analytical method for determination of morantel citrate in formula feeds using liquid chromatograph (LC) was improved. First, 10.0 g of sample was added with 100 mL of methanol-water (17:3). For non-heated formula feeds, the samples were extracted at room temperature. For heated formula feeds, the samples were extracted at 40 °C. After the sample solutions were purified by basic alumina column chromatography (Merck, Aluminiumoxid 90 aktiv basisch Art. 1076), and subjected to LC with a UV detector at 320 nm for determination of morantel citrate. The LC separation was carried out on an ODS column (Showa Denko, Shodex C18M4E, 4.6 mm i.d.×250 mm, 5 µm) using phosphoric acid buffer solution-acetonitrile (4:1) as a mobile phase. A recovery test was conducted using three kinds of non-heated formula feeds added with morantel citrate at 15, 30 and 45 g/ton. The mean recoveries of morantel citrate were 90.3~103 % and the relative standard deviations (RSD) were within 4.6 %. A collaborative study was conducted in nine laboratories using two kinds of non-heated formula feeds for growing pig added with morantel citrate at 30 g/ton and heated formula feed for suckling pig designed with morantel citrate at 30 g/ton. The mean recovery of non-heated formula feed for growing pig 1 was 102 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) were 3.5 % and 3.0 % respectively. These values were 102 %, 2.8 % and 3.5 % for non-heated formula feed for growing pig 2 ; 96.4 % (recovery to designed value), 1.0 % and 2.3 % for heated formula feed for suckling pig respectively.

Key words: morantel citrate ; synthetic antibacterial ; feed additives ; formula feed ; liquid chromatograph (LC) ; feed ; collaborative study

キーワード：クエン酸モランテル；合成抗菌剤；飼料添加物；配合飼料；液体クロマトグラフ；飼料；共同試験

### 1 緒 言

クエン酸モランテルは、我が国においては「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、合成抗菌剤に分類される飼料添加物として指定され<sup>1)</sup>、ほ乳期子豚育成用及び子豚育成用配合飼料に 30 g/t の添加が認められている<sup>2)</sup>。

\* 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

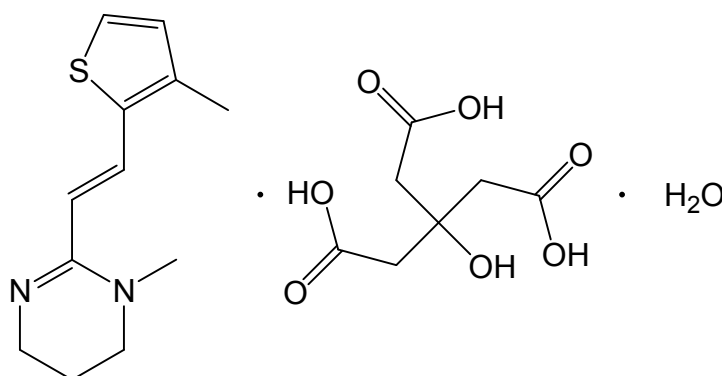
配合飼料中のクエン酸モランテルの定量法については、石黒<sup>3)</sup>、千原ら<sup>4)</sup>、松村ら<sup>5)</sup>及び山本<sup>6)</sup>の報告があり、既に飼料分析基準<sup>7)</sup>に記載されている。

現在、飼料分析基準に記載されているオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いて精製を行った後、液体クロマトグラフで定量する方法（以下「現行法」<sup>6)</sup>という。）では、一部の配合飼料中のクエン酸モランテルの定量値が低くなる事例が認められており、改良が試みられたが、ミニカラム処理の最適条件をみつけることができず、改良が困難であった。

平成 18 年 5 月まで飼料分析基準に記載されていた、メタノール-水（17+3）で抽出し塩基性アルミナで精製する方法（以下「旧法」<sup>5)</sup>という。）の問題点は、加熱試料においてクエン酸モランテルが十分に抽出されず、低回収率を呈する飼料があったことである。

今回、この問題点の改良を中心に、旧法を基にして、加熱処理された配合飼料に適用できる定量法を検討したので、その概要を報告する。

なお、クエン酸モランテルの構造式を Fig. 1 に示した。



1-methyl-2-[(*E*)-2-(3-methylthiophen-2-yl)ethenyl]-5,6-dihydro-4*H*-pyrimidine  
2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid salt monohydrate  
C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S MW: 430.47  
CAS No.: 69525-81-1

Fig. 1 Chemical structure of morantel citrate

## 2 実験方法

### 2.1 試料

非加熱処理の配合飼料（以下、「非加熱試料」という。）については、抗菌性物質を含まない市販の配合飼料（子豚育成用）を用い、それぞれにクエン酸モランテルを含有する複合製剤を添加し、クエン酸モランテルを 15, 30 及び 45 g/t 含有する試料を調製した。

また、加熱処理された配合飼料（以下、「加熱試料」という。）については、クエン酸モランテルを 30 g/t 含有する配合飼料（ほ乳期子豚育成用及び子豚育成用）を用い、比較するために、その同一製造ロットの加熱処理される前（非加熱試料）の配合飼料を用いた。

なお、検討に用いた配合飼料（加熱試料）の一例を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For suckling pig 1	Grains	57	Corn, Extruded soybean
	Oil seed meal	25	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn gluten meal
	Animal by-products	8	Dry whey, Fish meal, Dried skimmed milk
	Brans	1	Rice bran
	Others	9	Bakery waste, Animal fat, Calcium phosphate, Lactose, Calcium carbonate, Salt, Feed additives
For suckling pig 2	Grains	56	Corn
	Oil seed meal	20	Soybean meal
	Animal by-products	10	Fish meal, Dry whey, Dried skimmed milk
	Others	14	Bakery waste, Calcium carbonate, Calcium phosphate, Animal fat, Salt, Feed additives
For suckling pig 3	Grains	50	Corn, Soybean flour
	Oil seed meal	23	Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	5	Fish meal, Dry whey
	Brans	3	Corn distiller's dried grains with solubles
	Others	19	Bakery waste, Animal fat, Calcium phosphate, Calcium carbonate, Salt, Feed additives

## 2.2 試薬

### 1) クエン酸モランテル標準液

クエン酸モランテル（（社）日本科学飼料協会販売，純度 99.9 %）25 mg を正確に量って 250 mL の褐色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クエン酸モランテル標準原液を調製した（この液 1 mL は，クエン酸モランテルとして 0.1 mg 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（17+3）で正確に希釈し，1 mL 中に 0.1, 1, 2, 3, 4 及び 5  $\mu\text{g}$  を含有する各標準液を調製した。

### 2) リン酸緩衝液

リン酸二水素カリウム 6.8 g を水に溶かして 1 L にし，リン酸（1+10）で pH を 3.3 に調整した。

### 3) 塩基性アルミナ

カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（Merck 製 Aluminiumoxid 90 aktiv basisch Art. 1076（粒径 63~200  $\mu\text{m}$ （230~70 メッシュ）））を 130  $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間乾燥し，乾燥後，デシケーター内で保管した。

### 4) アセトニトリル，メタノールは液体クロマトグラフ用を用いた。その他，特記している以外の試薬については特級を用いた。

## 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) 防水マグネチックスターラー：アズワン製 OCTOPUS CS-4 (コントローラー) 及び S-1 (スターラー)
- 3) ウォーターバス：BÜCHI Labortechnik 製 B-490
- 4) 遠心分離器：コクサン製 H-36
- 5) 高速遠心分離器：Sigma Laborzentrifugen GmbH 製 1-14

## 2.4 定量方法

定量操作は、遮光した状態で行った。

### 1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水 (17+3) 100 mL を加え、加熱試料については、密栓して 40 °C で (非加熱試料については常温で)、30 分間かき混ぜて抽出した。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×g (3,000 rpm) で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とした。

### 2) カラム処理

塩基性アルミナ 5 g をカラム管 (内径 10 mm) に乾式充てんし、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、初めの流出液 5 mL を捨て、その後の流出液 5 mL のうち一定量を、5,000×g (10,000 rpm) で 5 分間遠心分離し、上澄み液を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による測定

試料溶液及び各クエン酸モランテル標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、Table 2 の測定条件に従って、クロマトグラムを得た。

Table 2 Operating conditions of LC for analyzing morantel citrate

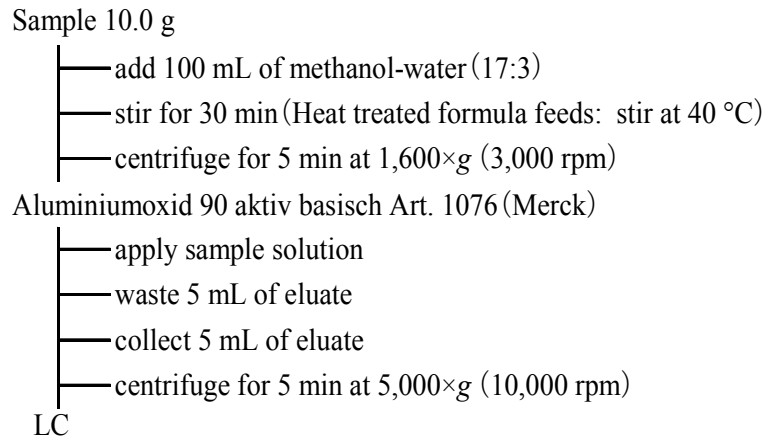
Column	Shodex C18M4E (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 µm)
Mobile phase	phosphoric acid buffer solution*-acetonitrile (4:1)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	UV detector (Wavelength:320 nm)
Column temperature	40 °C

\* Dissolve 6.8 g of potassium dihydrogenphosphate to 1L of water, adjust pH to 3.3 with phosphoric acid-water(1:10)

### 4) 計算

得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のクエン酸モランテル量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for morantel citrate in feeds

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線の作成

2.2 の 1) に従って調製した標準液各 20  $\mu\text{L}$  を液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積及び又は高さを求めて検量線を作成した。その結果、検量線は Fig. 2 のとおり 0.1~5.0  $\mu\text{g/mL}$  (注入量として 2~100 ng) の範囲で直線性を示した。

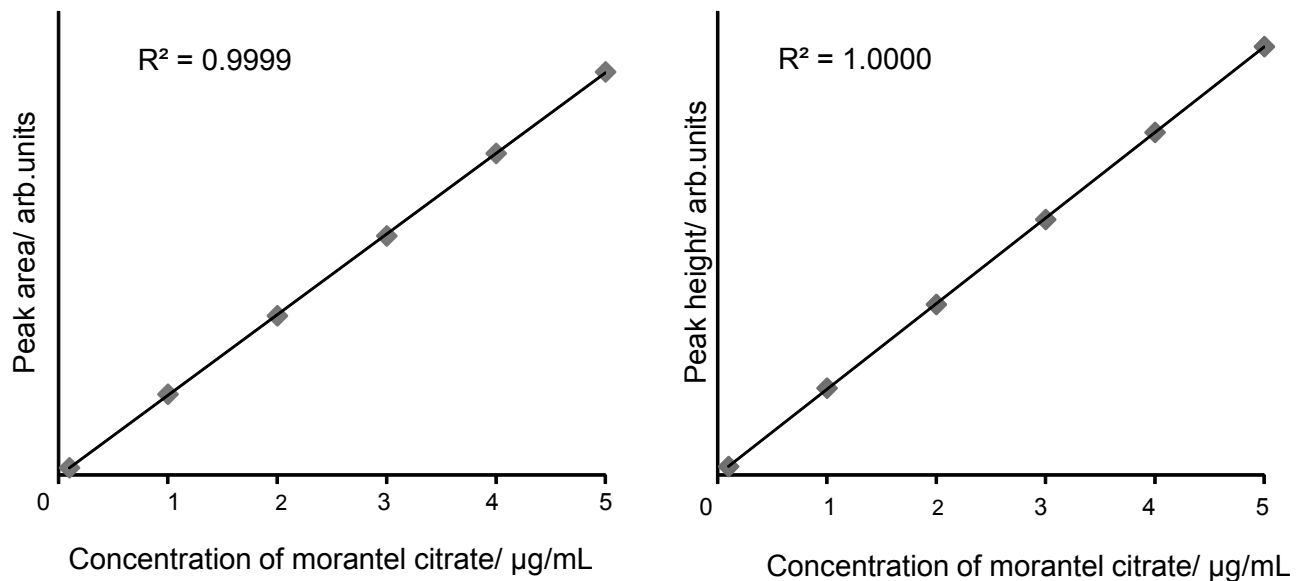


Fig. 2 Calibration curves of morantel citrate by peak area (left) and peak height (right)

#### 3.2 抽出操作の検討

クエン酸モランテルを含有している加熱試料 (ほ乳期子豚育成用及び子豚育成用) 4 種類及びその同一製造ロット加熱処理前の非加熱試料について以下の検討を行った。

##### 1) 旧法及び現行法の抽出溶媒の比較

抽出溶媒として、旧法の抽出溶媒であるメタノール-水 (17+3) <sup>5)</sup> 及び現行法の抽出溶媒である水-メタノール-酢酸 (15+4+1) <sup>6)</sup> を用いて、以下旧法に従って定量を行い、抽出溶媒の違い

による加熱処理前後の定量値の比較を行った。

その結果、Table 3 のとおり、抽出溶媒に水-メタノール-酢酸 (15+4+1) を用いると、加熱処理前及び処理後の定量値が変わらないのに対して、メタノール-水 (17+3) を用いると加熱処理後の定量値が若干低下しており、前者の方が良好な結果が得られた。

しかし、Fig. 3 のとおり、抽出溶媒として、メタノール-水 (17+3) 及び水-メタノール-酢酸 (15+4+1) を用いた際のクロマトグラフを比較すると、抽出液中に酢酸が含まれる場合は、夾雑ピークが多く認められ、クエン酸モランテルのピーク前後にも妨害ピークが出現し、一部の試料でクエン酸モランテルのピークと妨害ピークが重なって定量が困難であった。

これらのことから、抽出溶媒に水-メタノール-酢酸 (15+4+1) を採用するのは困難であると考えられた。一方、抽出溶媒として、メタノール-水 (17+3) を用いた際の定量値が低くなる原因を抽出時の温度の影響ではないかと推定し、抽出時の温度条件について検討を行うこととした。

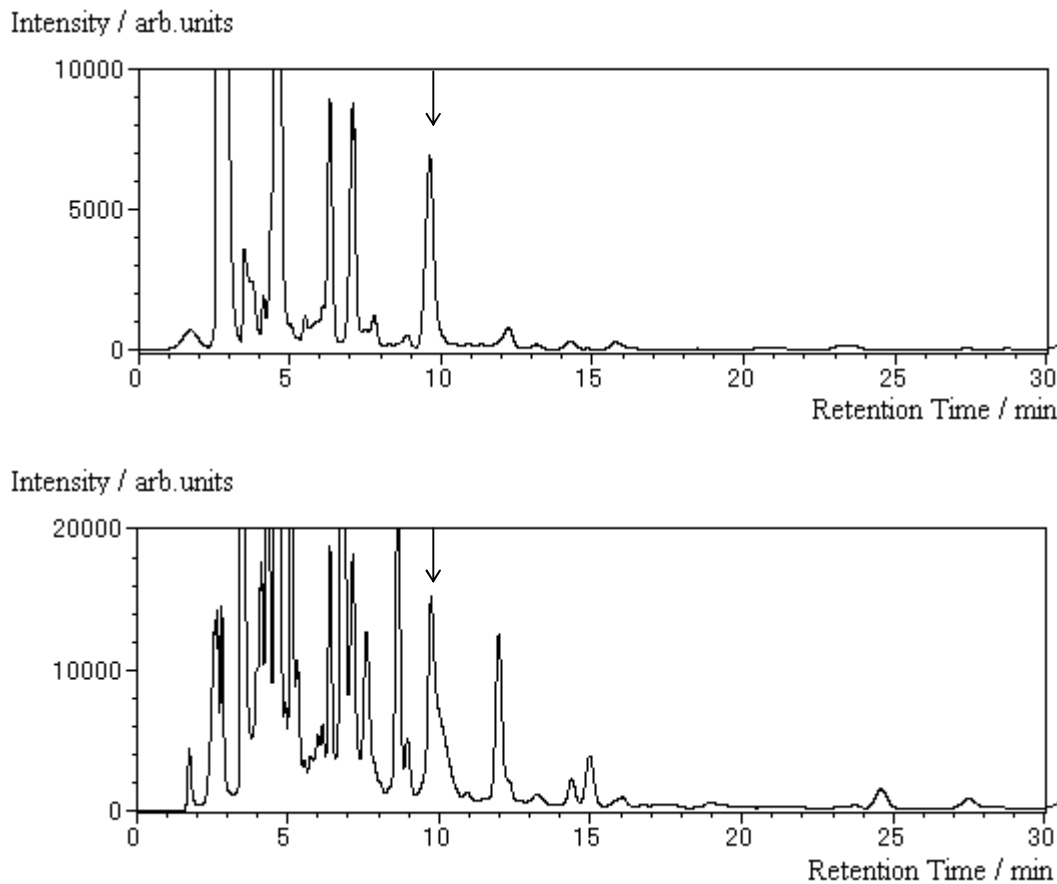


Fig.3 Chromatograms of sample solutions

LC conditions are shown in Table 2.

(Upper) Sample solution by extracting with methanol-water (17:3)

(Lower) Sample solution by extracting with water-methanol-acetic acid (15:4:1)

(The peak of morantel citrate is combined with an interference peak.)

(Arrows indicate the retention time of morantel citrate.)

Table 3 Comparison of recovery to designed value of morantel citrate by heat treatment process of sample and extracting solvent

Formula feed types	Before heat treatment process				After heat treatment process			
	Methanol-water (17:3)		Water-methanol-acetic acid (15:4:1)		Methanol-water (17:3)		Water-methanol-acetic acid (15:4:1)	
	Recovery to designed value <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery to designed value (%)	RSD (%)	Recovery to designed value (%)	RSD (%)	Recovery to designed value (%)	RSD (%)
For growing pig	101	1.2	102	1.9	89.2	3.5	97.5	0.5
For suckling pig 1	95.2	2.3	93.7	0.9	92.8	5.0	95.9	4.1
For suckling pig 2	102	0.5	101	0.5	104	5.8	100	0.2
For suckling pig 3	95.3	2.1	94.1	1.1	87.2	4.2	93.0	1.6

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

## 2) 抽出操作時の温度条件の比較

加熱試料について、抽出溶媒として、旧法の抽出溶媒であるメタノール-水 (17+3) 及び比較のため、現行法の抽出溶媒である水-メタノール-酢酸 (15+4+1) を用いて、抽出操作時に温度条件を変更し、以下旧法に従って定量を行い、抽出溶媒及び抽出操作時の温度条件の違いによる定量値の比較を行った。

まず、分析試料を量って褐色共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒を加えたのち、密栓した。次に、密栓した褐色共栓三角フラスコを、10 °C に設定した水中及び 40 °C に設定したウォーターバス中に防水スターラーを入れて、30 分間かき混ぜて抽出したのち、以下旧法に従って定量を行った。その結果、Table 4 のとおり、抽出溶媒に水-メタノール-酢酸 (15+4+1) を用いると、抽出時の温度によって定量値が変化しなかったのに対し、抽出溶媒にメタノール-水 (17+3) を用いると 10 °C では定量値が低かったが、40 °C では定量値が向上し、加熱処理による抽出効率の低下が改善された。また、抽出溶媒にメタノール-水 (17+3) を用いると、近接する妨害ピークが認められなかった。以上のことから、抽出溶媒としてメタノール-水 (17+3) を採用し、次に最適な抽出温度の検討をすることにした。

なお、本検討で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 4 Comparison of recovery to designed value of morantel citrate by extracting solvent and temperature

Formula feed types	Methanol-water (17:3)				Water-methanol-acetic acid (15:4:1)			
	10 °C		40 °C		10 °C		40 °C	
	Recovery to designed value <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery to designed value (%)	RSD (%)	Recovery to designed value (%)	RSD (%)	Recovery to designed value (%)	RSD (%)
For growing pig	66.6	0.3	104	0.6	101	1.0	101	0.8
For suckling pig 1	87.0	2.3	101	1.6	93.6	1.3	95.7	4.8
For suckling pig 2	88.6	3.3	103	1.8	100	0.5	101	0.9
For suckling pig 3	70.0	0.9	98.8	0.6	94.1	1.2	93.4	1.3

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

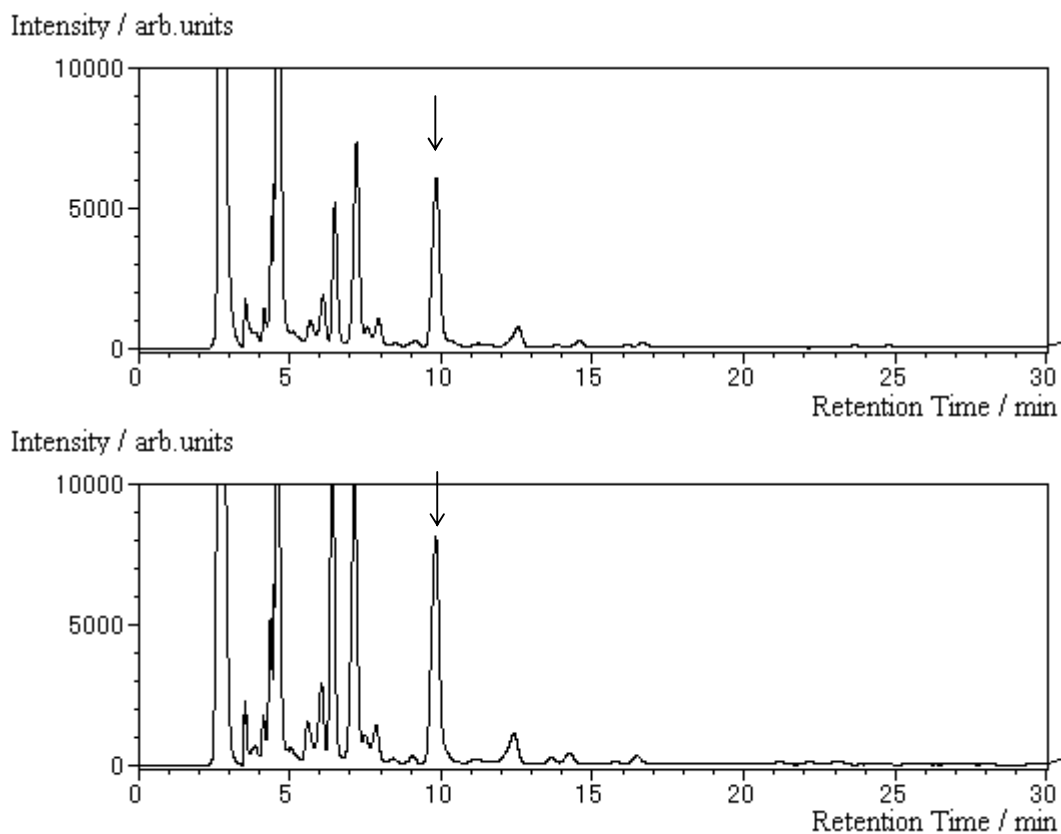


Fig. 4 LC chromatograms of sample solutions

LC conditions are shown in Table 2.

(Upper) Sample solution by extracting at 10 °C (Extracting solvent: methanol-water (17:3))

(Lower) Sample solution by extracting at 40 °C (Extracting solvent: methanol-water (17:3))

(Arrows indicate the peak of morantel citrate.)

### 3.3 抽出温度の検討

抽出時の温度による抽出効率を調べるため、クエン酸モランテルを含有している加熱試料（ほ



乳期子豚育成用) 5 種類及びその同一製造ロット加熱処理前の非加熱試料を用いて検討を行った。

まず、分析試料 10.0 g を量って褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水 (17+3) を加えた後、密栓した。次に、密栓した褐色共栓三角フラスコを、10, 20, 30, 40 及び 50 °C に保持したウォーターバス中に防水スターラーを入れて、30 分間かき混ぜて抽出したのち、以下本法に従って定量を行った。その結果、Fig. 5 のとおり、非加熱試料については抽出温度による定量値への影響は見られなかったのに対し、加熱試料については、いずれも抽出温度の上昇に伴い抽出効率の改善がみられ、40 °C で、ほぼ表示量に対する割合が一定に近くなっており、40 °C 以上では顕著な変化は認められなかった。

以上の結果から、非加熱試料については抽出温度による定量値への影響が見られなかったため常温で抽出することにした。加熱試料については、操作性及び安全性を考慮して、必要十分と考えられた 40 °C で抽出を行うことにした。

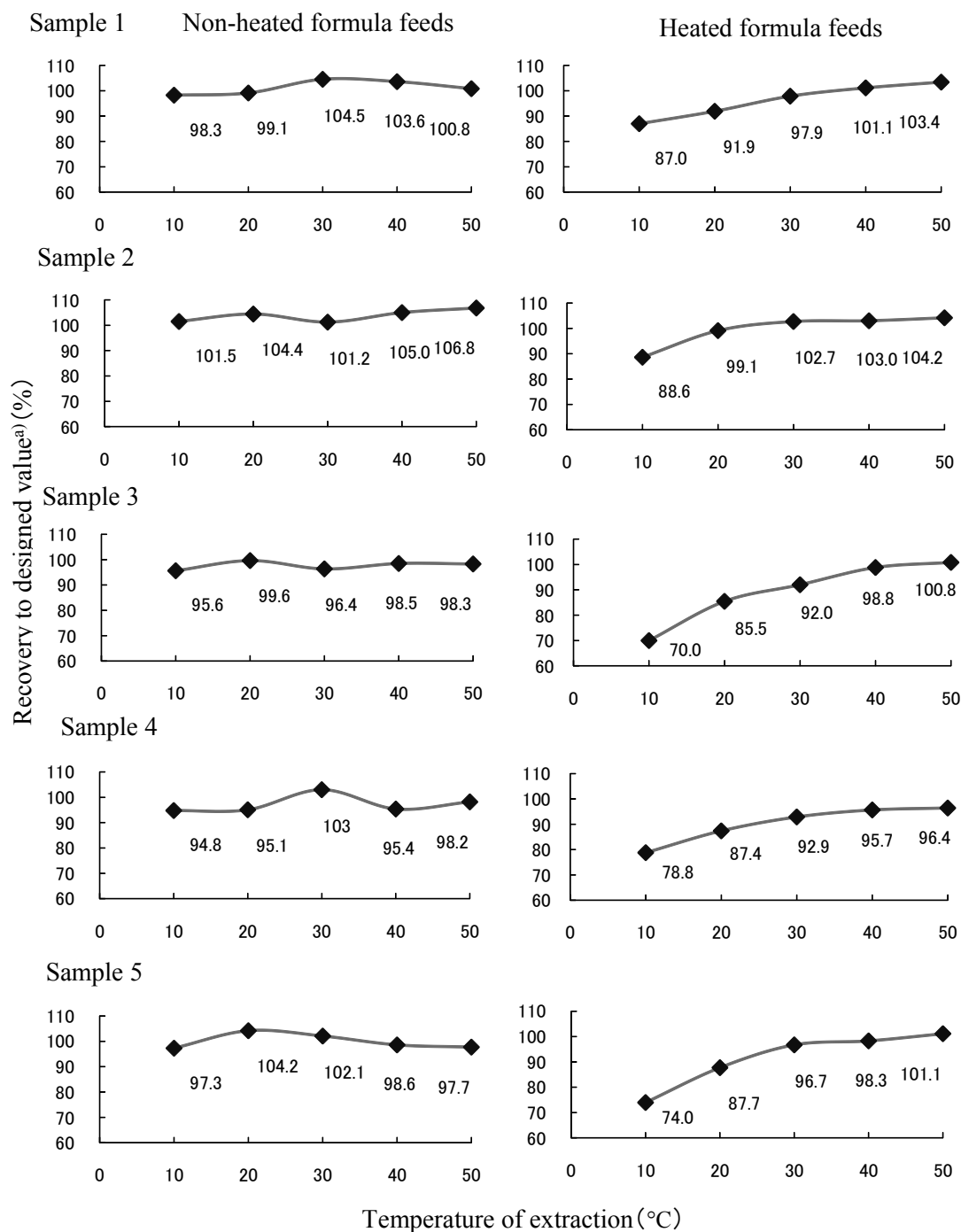


Fig. 5 Comparison of recovery to designed value of morantel citrate by temperature of extraction sample 1~5

(Non-heated formula feeds (left) and heated formula feeds (right))

LC conditions are shown in Table 2.

a) Mean ( $n=3$ )

### 3.4 カラム処理の検討

塩基性アルミナを用いたカラム処理の流出液の画分の確認を行った。

クエン酸モランテルを 30 g/t 含有するほ乳期子豚育成用加熱試料及びその同一製造ロット加熱処理前の非加熱試料を用い、2.4 の 1)により抽出した。その後、2.4 の 2)の塩基性アルミナのカラム処理に供し、その流出液を 2 mL ずつ 5 分画して各画分を液体クロマトグラフに注入し、クエン酸モランテル量を定量した。

その結果、Table 5 のとおりクエン酸モランテルは初めの 0~4 mL までの画分はその後の画分には比が高い定量値を示し、4 mL 以後は比較的安定した。これは旧法の基となった千原ら<sup>4)</sup>及び松村ら<sup>5)</sup>の報告と同様の傾向であることから、本法でも旧法を変更せずに初流の 5 mL を捨て、その後の 5 mL を試料溶液として用いることとした。

Table 5 Effluent pattern of morantel citrate from basic alumina column

Recovery to designed value <sup>a)</sup>	Fraction volume (mL)					
	0~2	~4	~6	~8	~10	~12
Before expander processing (%)	110	103	100	100	98.6	100
After expander processing (%)	106	102	98.8	97.2	99.9	96.7

a) Mean (n=3)

### 3.5 クエン酸モランテルの温度による影響について

本法では抽出時に 40 °C で 30 分間加温することから、クエン酸モランテルの温度による安定性を、抗菌性物質を含まない配合飼料から調製した空試験液を用いて、夾雑成分共存下で確認した。2.2 の 1)に従い、1 mL 中に 3 µg を含有するクエン酸モランテル標準液を調製し、褐色のガラス試験管に正確に 1 mL 入れ、50 °C 以下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。2.4 の 1) 及び 2)に従って抗菌性物質を含まない市販の配合飼料（ほ乳期子豚育成用）から調製した試料溶液のうち、その 1 mL を、前述の標準液を乾固した後の褐色のガラス試験管に正確に加えて残留物を溶かし、密栓した。その後、40 °C に設定したウォーターバス中で、遮光条件下で 0, 4, 8 及び 24 時間静置した後の試料溶液を液体クロマトグラフに注入して、経時変化を調べた。その結果、Table 6 のとおり、40 °C 条件下で 24 時間経過後でもクエン酸モランテルの濃度の低下は認められなかった。

Table 6 Stability for morantel citrate at 40 °C

	Elapsed time at 40 °C (hour)			
	0	4	8	24
Concentration <sup>a)</sup> (%)	102	102	103	102

a) n=2

### 3.6 妨害物質の検討

現在、クエン酸モランテル以外に飼料添加物に指定されている抗菌性物質は、抗生物質で 18 種類及び合成抗菌剤で 6 種類あり、このうち、クエン酸モランテルとの併用が認められているものは 12 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、セデカマイシン、ノシヘプタイド、バージニアマイシン、ピコザマイシン、フラボフォスフォリポール、硫酸コリスチン及びリン酸タイロシン) がある。これらは、既に本法と液体クロマトグラフィーの測定条件が同一である松村ら<sup>5)</sup>の報告において、クエン酸モランテルの定量を妨げるピークは認められないことが確認されている。

次に、クエン酸モランテルの添加が可能である市販の配合飼料（ほ乳期子豚育成用 4 種類及び子豚育成用 4 種類）を用い、本法に従って（抽出温度については 40 °C で行った）調製した試料溶液を液体クロマトグラフに注入し、妨害ピークの有無を確認したところ、定量を妨げるピークは認められなかった。

また、クエン酸モランテルの添加が可能である市販の配合飼料（ほ乳期子豚育成用 1 種類）を用いて、抽出温度以外を本法に従い、抽出温度については 50 °C で抽出操作を行って調製した試料を、液体クロマトグラフに注入し、妨害ピークの有無を確認したところ、40 °C で抽出操作を行った場合と同様に定量を妨げるピークは認められなかった。このことから、加温により定量を妨害する夾雑ピークが出るようなことはないと考えられた。

なお、妨害物質の検討で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 6 に示した。

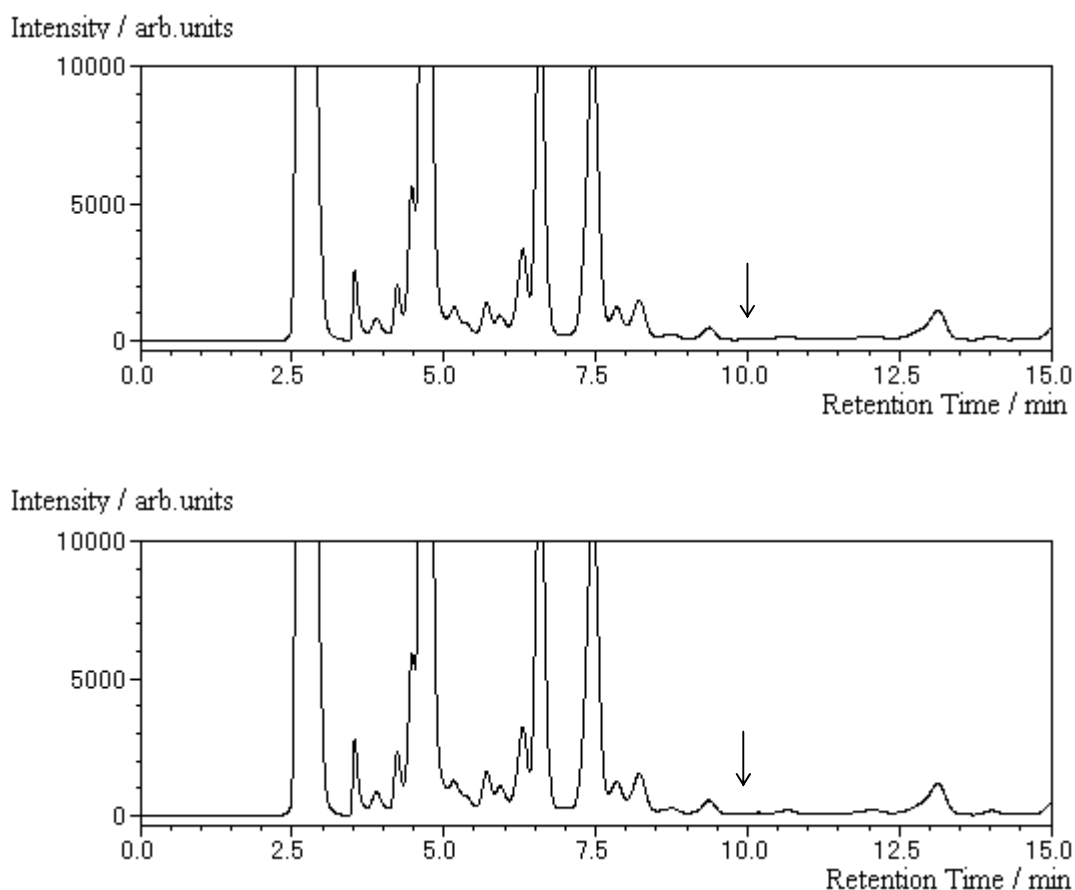


Fig. 6 LC chromatograms of blank solutions

LC conditions are shown in Table 2. (Arrows indicate the peak of morantel citrate.)  
 (Upper) Sample solution of formula feed for suckling pig by extracting at 40 °C (not spiked)  
 (Lower) Sample solution of formula feed for suckling pig by extracting at 50 °C (not spiked)

### 3.7 加熱処理された配合飼料への分析法適用の検討

加熱処理された配合飼料への本法の適用を確認するため、クエン酸モランテルを 30 g/t を含有する市販の加熱試料（ほ乳期子豚育成用）及びその同一製造ロット加熱処理前の非加熱試料各 5 種類について、本法により 3 点併行で定量し、その表示に対する定量値の割合及び繰返し精度（RSD）をもとめ、比較試験を実施した。

なお、加熱加工形態として、ペレット加工（粉状の飼料をペレットミルによって、加圧して蒸気を吹き込みながらダイを通して押し出して短い円柱状に成型する）、クランブル加工（ペレットを粗くくたく）及びエキスパンダー加工（飼料を円筒の中に入れ、蒸気と圧力を加え、大気中に放出することで、急激な膨潤を起こさせ、飼料を膨化させる）した飼料を使用した。

その結果、Table 7 のとおり、各同一製造ロットの試料における加熱処理の前後において、定量値及びその繰返し精度に特に差異は認められなかった。

このことから、本法において、加熱処理の有無は定量値に影響を与えないことが明らかになった。

Table 7 Comparison of recovery to designed value of morantel citrate by before and after heat treatment process sample

Type of heat treatment process	Before heat treatment process		After heat treatment process	
	Recovery to designed value <sup>a),c)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery to designed value <sup>a),d)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
	(%)	(%)	(%)	(%)
Expander pellet crumble 1	95.2	2.3	101	1.6
Expander pellet crumble 2	102	0.5	103	1.8
Expander pellet crumble 3	95.3	2.1	98.8	0.6
Expander pellet crumble 4	99.5	4.6	98.3	1.4
Pellet crumble	97.1	3.3	95.7	0.3

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Extract at room temperature

d) Extract at 40 °C

### 3.8 添加回収試験

試料として、非加熱試料については、2.1 で調製したクエン酸モランテルとして 15, 30 及び 45 g/t を含有する配合飼料を用いて、加熱試料については当方で任意の濃度のクエン酸モランテルを含有した配合飼料を製造もしくは入手することが困難であることから、クエン酸モランテルとして 30 g/t を含有する市販の配合飼料をもちいて、本法により 3 点併行で定量し、回収率（加熱試料については表示量に対する割合）及び繰返し精度を検討した。

その結果は、Table 8 及び 9 のとおり、非加熱試料についてはクエン酸モランテルの平均回収率は 90.3~103 %、その繰返し精度は、相対標準偏差（RSD）として 4.6 %以下、加熱試料についてはクエン酸モランテルの表示に対する割合は 95.7~103 %、その繰返し精度は、相対標準偏差（RSD）として 2.4 %以下の成績が得られた。添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 7 に示した。

Table 8 Recoveries of morantel citrate from mash formula feeds

Spiked level (g/ton)	Formula feed types					
	For growing pig 1		For growing pig 2		For growing pig 3	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)
15	98.6	3.6	95.7	2.4	96.6	4.6
30	102	3.2	95.7	0.5	99.6	3.7
45	90.3	2.9	103	3.0	101	0.3

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 9 Recoveries of morantel citrate from heat treated formula feeds

Type of heat treatment process	Designed value : 30 (g/ton)	
	Recovery to designed value <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
	(%)	(%)
Expander pellet crumble 1	101	1.6
Expander pellet crumble 2	103	1.8
Expander pellet crumble 3	98.8	0.6
Expander pellet crumble 4	98.3	1.4
Pellet crumble	95.7	0.3
Pellet	101	2.4

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

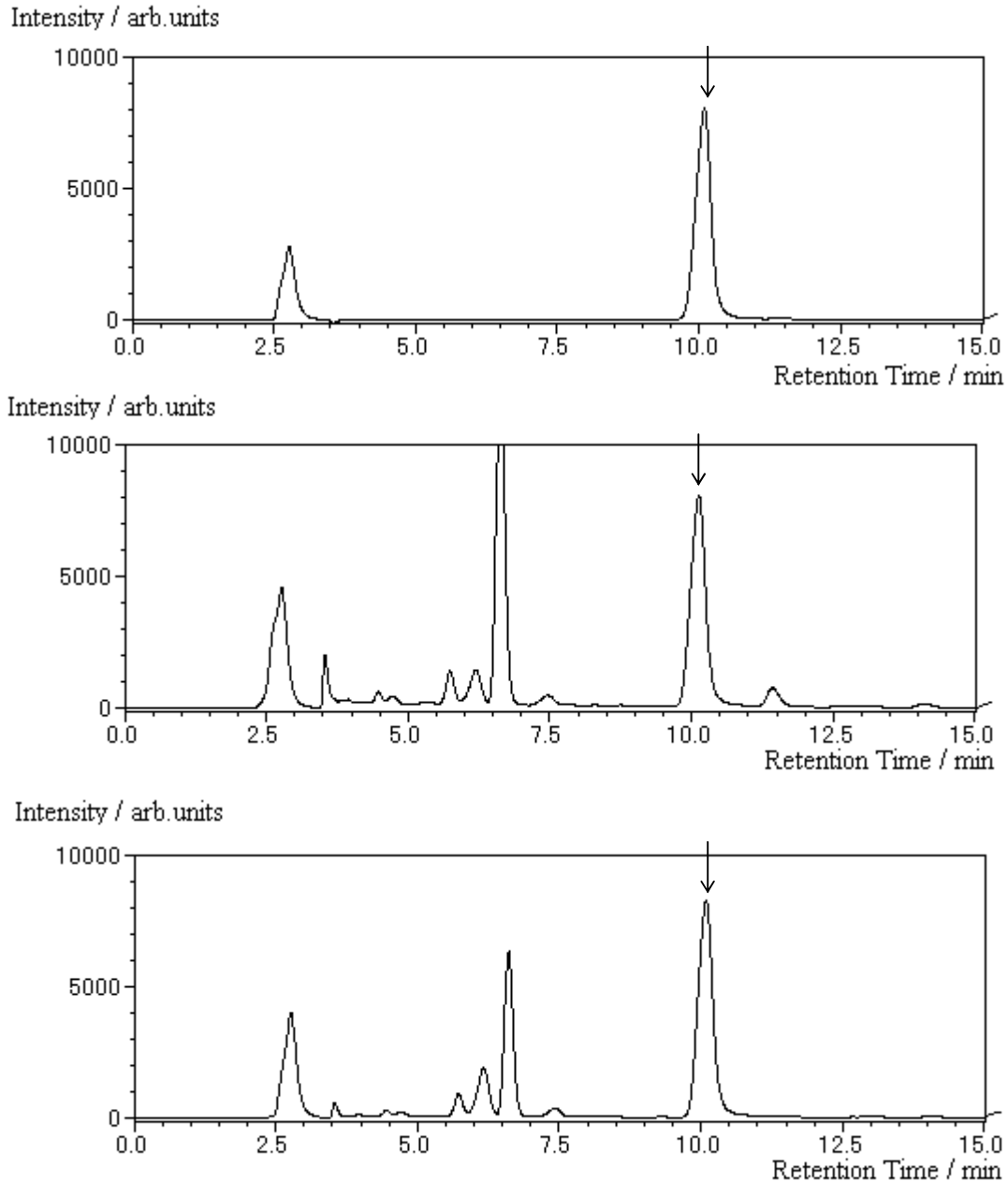


Fig. 7 Chromatograms of morantel citrate

(Upper) Standard solution (The amount of morantel citrate is 60 ng.)

(Middle) Sample solution of formula feed designed at 30 g/ton (Crumble)

(Lower) Sample solution of formula feed spiked at 30 g/ton (Mash)

(Arrows indicate the peak of morantel citrate.)

### 3.9 現行法との比較

本法及び現行法の試験成績を比較するため、3種類のクエン酸モランテルを含有する市販配合飼料について、添加された表示量(30 g/t)に対する割合を本法及び現行法により定量し求めた。

また、2.1で調製したクエン酸モランテルとして30 g/tを含有する配合飼料1種類を用いて、本法及び現行法により添加回収試験を実施した。

その結果、Table 10 のとおり、定量値の改善が認められた。

Table 10 Comparison of recovery to designed value of morantel citrate by the existing and this method

Formula feed types	Shape of feed	This method			Existing method		
		Recovery to designed value <sup>a)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery to designed value <sup>a)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)
For suckling pig 1	pellet	101		2.4	86.0		1.8
For suckling pig 2	mash	94.9		2.2	85.9		2.0
For growing pig 1	crumble	94.6		0.9	84.9		3.7
For growing pig 2	mash		99.6	3.7		87.7	2.3

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.10 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

非加熱試料（子豚育成用配合飼料 2 種類）及び加熱試料（ほ乳期子豚育成用配合飼料 1 種類）を用い、非加熱試料については、抗菌性物質を含まない市販の配合飼料（子豚育成用配合飼料）を 1 mm の網ふるいを通すまで粉砕したのち、クエン酸モランテルを含有する複合製剤を添加し、クエン酸モランテルを 30 g/t 含有する試料を調製した。加熱試料については、市販のクエン酸モランテルの表示量が 30 g/t である配合飼料を用い、1 mm の網ふるいを通すまで粉砕して調製した。

均質性の確認については、作成した試料が 50 袋未満であったため、ランダムに抜き取った 5 袋の併行分析を実施した。その結果、非加熱試料 1 では、平均回収率は 99.5 %、その繰返し精度は、相対標準偏差（RSD）として 2.7 %、非加熱試料 2 では、平均回収率は 102 %、その繰返し精度は、相対標準偏差（RSD）として 2.3 %、加熱試料では、表示に対する割合は 95.4 %、その繰返し精度は、相対標準偏差（RSD）として 0.7 %であり、試料袋間の均質性に特に問題は認められなかった。

調製したクエン酸モランテルを 30 g/t 含有する非加熱試料（子豚育成用配合飼料）2 種類及びクエン酸モランテルの表示量が 30 g/t である加熱試料（ほ乳期子豚育成用配合飼料）1 種類を用いて、JA 東日本くみあい飼料株式会社、協同飼料株式会社研究所、財団法人日本食品分析センター彩都研究所、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、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センター（計 9 試験室）において本法に従って共同試験を実施した。

その結果は Table 11 のとおりであり、非加熱試料 1 では平均回収率は 102 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差( $RSD_f$  及び  $RSD_R$ )として 3.5 %及び 3.0 %であり、HorRat は 0.31 であった。非加熱試料 2 では、平均回収率は 102 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_f$  及び  $RSD_R$  として 2.8 %及び 3.5 %であり、HorRat は 0.37 であった。加熱試料では、表示量に対する割合は 96.4 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ



RSD<sub>r</sub>及びRSD<sub>R</sub>として1.0%及び2.3%であり、HorRatは0.24であった。

参考のため、各試験室で使用した液体クロマトグラフの機種等をTable 12に示した。

Table 11 Collaborative study results of morantel citrate

Lab. No.	Feed types					
	Non-heated feed		Non-heated feed		Heated feed	
	Formula feed for growing pig 1 (g/t)	Formula feed for growing pig 1 (g/t)	Formula feed for growing pig 2 (g/t)	Formula feed for growing pig 2 (g/t)	Formula feed for suckling pig (g/t)	Formula feed for suckling pig (g/t)
1	30.8	30.4	29.9	31.3	27.7	28.0
2	30.3	30.9	29.6	29.0	30.1	29.5
3	30.2	30.2	29.0	29.7	28.3	28.4
4	30.4	30.0	31.4	29.8	29.0 <sup>e)</sup>	30.9 <sup>e)</sup>
5	29.8	30.0	29.7	30.3	28.8	28.6
6	30.0	32.6	33.0	31.1	29.5	29.4
7	30.1	29.4	29.8	30.3	29.5	29.0
8	29.4	32.8	32.1	30.3	28.7	29.0
9	29.9	30.9	30.7	31.2	29.5	28.9
Spiked level (g/t)	30.0		30.0		30.0 <sup>f)</sup>	
Mean value <sup>a)</sup> (g/t)	30.5		30.5		28.9	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	102		102		96.4 <sup>g)</sup>	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	3.5		2.8		1.0	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	3.0		3.5		2.3	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	10		10		10	
HorRat	0.31		0.37		0.24	

a) Non-heated feeds:  $n=18$ , Heated feed:  $n=16$  (without Lab No.4)

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

e) Data excluded by Cochran Test

f) Designed value

g) Recovery to designed value

Table 12 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	Instrument	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Agilent Technologies Agilent 1100 Series	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (4.6×250 mm, 5 μm)
2	Agilent Technologies Agilent 1100 Series	Showa Denko Shodex C18M4E (4.6×250 mm, 5 μm)
3	Agilent Technologies Agilent 1100 Series	Showa Denko Shodex C18M4E (4.6×250 mm, 5 μm)
4	Waters Waters2487	Showa Denko Shodex C18M4E (4.6×250 mm, 5 μm)
5	Shimadzu Prominence	Showa Denko Shodex C18M4E (4.6×250 mm, 5 μm)
6	Shimadzu Prominence	Shiseido CAPCEL PAK C18 (4.6×250 mm, 5 μm)
7	Shimadzu Prominence	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (4.6×250 mm, 5 μm)
8	JASCO JASCO X-LC 3185PU	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (4.6×250 mm, 5 μm)
9	Agilent Technologies Agilent 1100 Series	GL Sciences Inertsil ODS-3 (4.6×250 mm, 5 μm)

#### 4 まとめ

旧法を基に、配合飼料中のクエン酸モランテルの液体クロマトグラフによる定量法の改良を検討したところ、次の結果が得られた。

- 1) 検量線は 0.1~5.0 μg/mL (注入量として 2~100 ng) の範囲で直線性を示した。
- 2) 抽出溶媒としてメタノール-水 (17+3) を用い、非加熱試料については常温で、加熱試料については 40 °C で 30 分間抽出を行うことにより良好な測定が可能であった。
- 3) 配合飼料 8 種類について、本法に従って調製した試料溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムから、妨害物質の有無を確認したところ、妨害物質は認められなかった。
- 4) クエン酸モランテルを含有する市販の配合飼料について、その同一製造ロットの試料における加熱処理の前後において、定量値及びその繰返し精度に特に差異は認められなかった。
- 5) 非加熱試料についてはクエン酸モランテルの平均回収率は 90.3~103 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 4.6 %以下、加熱試料についてはクエン酸モランテルの表示に対する割合は 95.7~103 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 2.4 %以下の成績が得られた。
- 6) クエン酸モランテルを 30 g/t 含有する非加熱試料 (子豚育成用配合飼料) 2 種類及びクエン酸モランテルの表示量が 30 g/t である加熱試料 (ほ乳期子豚育成用配合飼料) 1 種類を用いて、9 試験室において、本法による共同試験を実施した。その結果、非加熱試料 1 では平均回収率は 102 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD<sub>f</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) として 3.5 % 及び 3.0 % であり、HorRat は 0.31 であった。非加熱試料 2 では、平均回収率は 102 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD<sub>f</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 2.8 % 及び 3.5 % であり、HorRat

は 0.37 であった。加熱試料では、表示量に対する割合は 96.4%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 1.0% 及び 2.3% であり、HorRat は 0.24 であった。

## 謝 辞

本検討におきまして、ご協力いただきました JA 東日本くみあい飼料株式会社の各位に感謝の意を表します。

また、検討用飼料を提供していただいた JA 東日本くみあい飼料株式会社、日清丸紅飼料株式会社、豊橋飼料株式会社、鹿島飼料株式会社、コーキン化学株式会社、中部飼料株式会社、日本農産工業株式会社、西日本飼料株式会社の各位に感謝の意を表します。

更に、共同試験に参加していただいた JA 東日本くみあい飼料株式会社、協同飼料株式会社研究所、財団法人日本食品分析センター彩都研究所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く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) 石黒瑛一：高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のクエン酸モランテルの定量法，飼料研究報告，11，75-85 (1986).
- 4) 千原哲夫，堀切正賀寿：高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のクエン酸モランテルの定量法，飼料研究報告，19，73-87 (1994).
- 5) 松村惣一郎，福本裕二，鬼頭敦司，小野雄造，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クエン酸モランテルの定量，飼料研究報告，22，77-86 (1997).
- 6) 山本克己：高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のクエン酸モランテルの定量法の改良，飼料研究報告，31，98-108 (2006).
- 7) 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).
- 8) 千原哲夫，松村惣一郎，橋本亮，堀切正賀寿：高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中の低濃度クエン酸モランテルの定量法，飼料研究報告，18，68-79 (1993).