

技術レポート

4 ポリエーテル系抗生物質の微生物学的定量に用いる塩基性アルミナについて

榎本 舞弓*, 橋本 仁康*, 山多 利秋*

Comparison of Basic Alumina for Use in Microbiological Assays of Polyether Antibiotics

Mayu ENOMOTO*, Yoshiyasu HASHIMOTO* and Toshiaki YAMATA*

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

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（サリノマイシンナトリウム（以下「SL」という．））、ナラシン（以下「NR」という．）及びモネンシンナトリウム（以下「MN」という．））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は、千原ら²⁾がその適用性を検討し、Aluminum oxide Type F-20（Sigma-Aldrich 製）又はこれと同等のものをを用いることが飼料分析基準の別表 2 に規定されている。しかし、当該品は既に販売されておらず、また、カタログ番号が同一の後継品 Aluminum oxide Type CG-20 は、予備検討の結果、当該品との同等性が確認できなかった。

今回、複数のカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナを比較検討し、Aluminum oxide Type F-20 の代替となり得る同等品に係る知見を得たので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試 料

市販の牛用配合飼料及び鶏用配合飼料について、1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎したものをを用いた。検討に用いた飼料の種類等を表 1 に示した。

2.2 試 薬

- 1) 微生物学的定量法では水は滅菌水、メタノールは試薬特級を用い、液体クロマトグラフ法では水は超純水（JIS K 0211 に定める 5218 の超純水）、メタノールは液体クロマトグラフ用を用いた。
- 2) サリノ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標準液
飼料分析基準（液体クロマトグラフ法及び微生物学的定量法）に準じて調製した。
- 3) 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を表 2 に示し、飼料分析基準に規定されている塩基性アルミナを F とした。

また、Sigma-Aldrich が F の後継品としている Aluminum oxide Type CG-20 について、そのロット番号が異なる 2 ロット（SLBC5525 及び SLBF0856）を入手し、予備検討を実施したとこ

* 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

ろ、MN の流出パターンが F と大きく異なった（A と C の中間程度）ことから、本検討に用いる塩基性アルミナからは除外した。

なお、検討途中（2014年12月）で B のロット番号が変更となったため、変更後の塩基性アルミナを Ba と表記し、区別した。

表 1 検討に用いた飼料の種類等

試料番号	飼料の種類	含有するポリエーテル系 抗生物質の名称及び量	添加したポリエーテル系 抗生物質の名称及び量
M1	肉用牛肥育用配合飼料	MN, 30 g(力価)/t	---
M2	肉用牛肥育用配合飼料	MN, 30 g(力価)/t	---
M3	肉用牛肥育用配合飼料	MN, 30 g(力価)/t	---
M4	肉用牛肥育用配合飼料	MN, 30 g(力価)/t	---
M5	肉用牛肥育用配合飼料	MN, 30 g(力価)/t	---
M6	大すう飼育用配合飼料	なし	MN, 80 g(力価)/t
M7	成鶏飼育用配合飼料	なし	MN, 80 g(力価)/t
S1	ブロイラー肥育前期用配合飼料	SL, 50 g(力価)/t	---
S2	ブロイラー肥育前期用配合飼料	SL, 50 g(力価)/t	---
S3	ブロイラー肥育後期用配合飼料	SL, 50 g(力価)/t	---
S4	ブロイラー肥育後期用配合飼料	SL, 50 g(力価)/t	---
S5	ブロイラー肥育後期用配合飼料	SL, 50 g(力価)/t	---
S6	幼すう飼育用配合飼料	SL, 50 g(力価)/t	---
S7	肉用牛肥育用配合飼料	なし	SL, 15 g(力価)/t
N1	ブロイラー肥育後期用配合飼料	NR, 80 g(力価)/t	---
N2	ブロイラー肥育後期用配合飼料	なし	NR, 80 g(力価)/t
N3	大すう飼育用配合飼料	なし	NR, 80 g(力価)/t
N4	成鶏飼育用配合飼料	なし	NR, 80 g(力価)/t
N5	成鶏飼育用配合飼料	なし	NR, 80 g(力価)/t

表 2 検討に用いたカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ

記号	メーカー	品名	ロット番号
A	和光純薬工業	Alumina, Activated	CTR6115
B	Merck Millipore	Aluminium oxide 90 active basic	TA 1897976 405
Ba	Merck Millipore	Aluminium oxide 90 active basic	TA 1929376 442
C	Merck Millipore	Aluminium oxide 60 active basic	TA 1873267 338
D	MP Biomedicals Germany	EcoChrom MP Alumina B, Act. I	13
E	Sigma-Aldrich	Aluminum oxide	MKBQ1135V
F ^{a)}	Sigma-Aldrich	Aluminum oxide Type F-20	112K0955

a) 飼料分析基準の別表 2 に規定されているもの

4) 塩基性アルミナの水分活性度の調整

塩基性アルミナを 130 °C で 2 時間乾燥した後、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³⁾の活性度 III（水分含量 6 v/w%）⁴⁾となるように調整した。

なお、活性度を調整しない塩基性アルミナと区別するため、活性度 III に調整した塩基性アルミナを塩基性アルミナ（活性度 III）と表記し、各記号の後ろには(act.III)と付記した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-200 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数 14000 rpm）
- 2) メンブランフィルター：エキクロディスク CR 日本ポール製（PTFE，孔径 0.45 μm ）
- 3) 液体クロマトグラフ装置
オートサンプラー：SIL-0AD VP 島津製作所製
溶離液用ポンプ：LC-10AD VP 島津製作所製
カラム恒温槽：CTO-10A VP 島津製作所製
反応液用ポンプ：LC-10AD VP 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-10A VP 島津製作所製

2.4 試験方法

2.4.1 液体クロマトグラフ法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 100 mL の共栓三角フラスコに入れ，メタノール-水（9+1）50 mL を加え，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，カラム処理に供する試料溶液とした．なお，抗生物質を含まない配合飼料については，ろ液の一定量に抗生物質の標準原液の一定量を加え，カラム処理に供する試料溶液とした．

2) カラム処理

カラム管（内径 14 mm）にカラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ 12 g を乾式で充てんし，カラムを調製した．試料溶液約 35 mL をカラムに入れ，流出液の 15 mL までは 2.5 mL ずつの 6 画分，15 ~ 25 mL までは 5 mL ずつの 2 画分を分取し，それぞれ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．

3) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各抗生物質標準液各 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

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 島津製作所製（内径 4.6 mm，長さ 150 mm，粒径 5 μm ，細孔径 12 nm）

溶離液：メタノール-水-酢酸（940+60+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 を加えて溶かした（用時調製）．

流速：溶離液 0.6 mL/min，反応液 0.6 mL/min

反応槽温度：95 $^{\circ}\text{C}$

4) 計算

得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し，試料溶液中の各抗生物質量を算出した．

2.4.2 微生物学的定量法

飼料分析基準に規定された SL，NR 及び MN の微生物学的定量法（平板法）により試験し

た。

なお、塩基性アルミナ F と検討に用いた A~E を比較することを目的としているため、2-2 用量法における高濃度標準液及び低濃度標準液は、同一抽出液を F でカラム処理し、調製した高濃度試料溶液及び低濃度試料溶液をそれぞれ用いた。このため、必要な抽出液量に応じて、試料採取量及び抽出溶媒量を等倍（つまり F と比較したい塩基性アルミナの数足したものに、本来、微生物学的定量法で規定された試料採取量及び抽出溶媒量を等倍）して抽出液を調製した。

3 結果及び考察

3.1 塩基性アルミナカラムからの流出状況の比較

飼料分析基準で規定されている塩基性アルミナ F との同等性を確認するため、試料 M1 について、A~F を用い、簡便に定量可能である液体クロマトグラフィーにより回収率を求めた。2.4.1 に従い分画試験を行った結果、MN の流出パターンは図 1 の i のとおり、用いた塩基性アルミナの種類によって顕著な差が認められた。特に、A、C 及び D において、MN は、初めは塩基性アルミナに吸着して低回収となり、その後急速な流出による過回収が認められた。

一方、試料 S1 について同様に試験した結果、SL の流出パターンは図 1 の ii のとおり、用いた塩基性アルミナの種類による影響は認められなかった。

なお、NR は、SL にメチル基が 1 つ付加された化学構造であり、NR の塩基性アルミナにおける挙動が SL に酷似していることが千原ら²⁾の検討結果から推測されたことから、NR についての流出状況の比較は省略した。

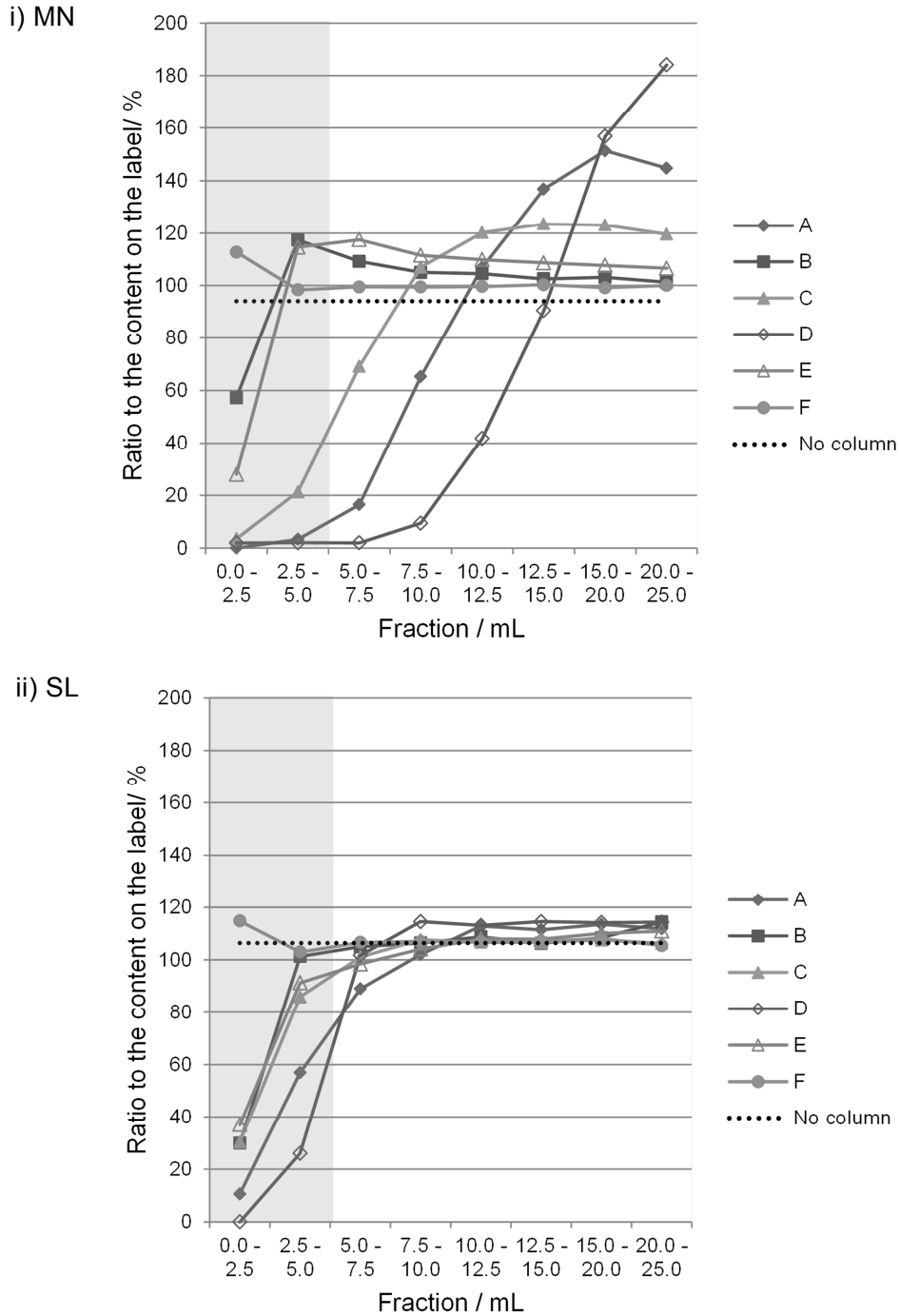


図1 塩基性アルミナカラムからの流出パターン

Ratio to the content on the label : 各画分における定量値の表示量に対する割合 (n = 2)

No column : 試料溶液をカラム処理せずに得られた定量値

灰色範囲 : 飼料分析基準では捨てる画分に該当

3.2 塩基性アルミナ (活性度 III) からの流出状況の確認

塩基性アルミナの活性度 (吸着力) は水分含量に大きく影響されることから、塩基性アルミナ A~F の水分を測定した。その結果、F が約 6 %であった他はすべて水分をほとんど含まないものであったことから、F は Brockmann スケールの活性度 III に相当し、A~E はいずれも活性度 I に

相当した。

塩基性アルミナの活性度の違いによって、カラム処理における MN の吸着の度合いが異なることが推測されたことから、水を加えて塩基性アルミナの活性度を下げることが検討された。MN の流出パターンが F に最も近似していた B 及び最も相違していた D について、2.2 の 4) により活性度 III に調整し、再度 2.4.1 により分画試験を行った。なお、カラム処理に供する試料溶液は、試料 M7 の抽出液 100 mL に対して MN 標準液を 1600 µg(力価)相当量加えたものを用いた。

その結果、B (act.III)及び D (act.III)を用いた場合の MN の流出パターンは図 2 のとおり、図 1 の i に示した B 及び D のそれらとは異なることが認められ、特に B (act.III)の挙動は、F に近似する効果が認められた。

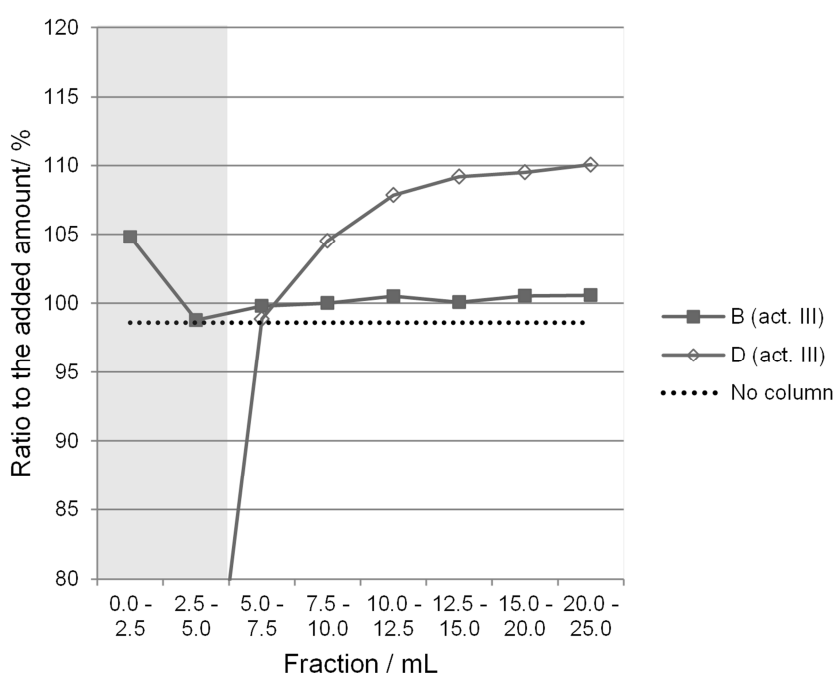


図 2 塩基性アルミナ（活性度 III）カラムからの流出パターン

Ratio to the added amount：各画分における定量値の添加量に対する割合（ $n = 1$ ）

No column：試料溶液をカラム処理せずに得られた定量値

灰色範囲：飼料分析基準では捨てる画分に該当

3.3 微生物学的定量法による活性度調整の必要性の確認

塩基性アルミナ F に最も近似していた B 及び B (act.III)を用い、2.4.2 に従い F を対照として SL, NR 及び MN の微生物学的定量法による回収率をそれぞれ求めた。

その結果は、表 3 の i ~ iii のとおり、B (act.III)では回収率は各試料でほぼ一致し、B の活性度を活性度 III に調整した効果が認められたが、B では SL 及び NR の試料の一部で回収率が高くなる傾向が認められた。

表3 微生物学的定量法による比較（活性度調整の必要性）

i) MN			ii) SL			iii) NR		
試料	回収率 ^{a)} / %		試料	回収率 ^{a)} / %		試料	回収率 ^{a)} / %	
	B ⁺ vs F	B vs F		B ⁺ vs F	B vs F		B ⁺ vs F	B vs F
M1	98.16	102.35	S1	100.77	99.09	N2	97.99	110.44
M2	100.00	101.04	S2	98.65	101.98	N4	99.18	105.96
M3	100.00	100.27	S3	98.47	106.32	N5	100.73	105.16

a) $n = 1$

B⁺ vs F : 2-2 用量法における標準液は F により調製した液を, 試料溶液は同じ抽出液を B (act.III)により調製した液を用いた.

B vs F : 2-2 用量法における標準液は F により調製した液を, 試料溶液は同じ抽出液を B により調製した液を用いた.

3.4 微生物学的定量法による定量値比較

塩基性アルミナ F の同等品として適当であると考えた B (act.III)は, 検討途中でロット番号が変更となったため, 変更後の Ba (act.III)について, 各抗生物質 5 種類以上の試料を用い, 2.4.2 に従い F を対照とした微生物学的定量法による回収率を求め, その結果を表 4 の i ~ iii に示した. t -検定 (有意水準 5 %) の結果, Ba (act.III)による定量値と F による定量値に有意差は認められなかった. また, Ba (act.III)の F に対する回収率の 95 %信頼区間は, MN で 99.98 ~ 100.38 %, SL で 98.94 ~ 100.50 %, NR で 99.53 ~ 100.93 %と問題のない範囲であったことから, Ba (act.III)を F の同等品として用いることができると判断した.

表4 微生物学的定量法による比較 (Ba (act.III)と現行品 F との同等性の確認)

i) MN		ii) SL		iii) NR	
試料	回収率 ^{a),b)} / %	試料	回収率 ^{a),b)} / %	試料	回収率 ^{a),b)} / %
M1	100.26	S1	99.77	N1	100.36
M2	100.27	S2	100.00	N2	100.19
M3	100.51	S4	97.86	N3	100.96
M4	100.25	S5	99.76	N4	100.73
M5	100.00	S6	100.25	N5	98.91
M6	99.80	S7	100.67		
平均値 / %	100.18	平均値 / %	99.72	平均値 / %	100.23
95 %信頼区間	99.98 ~	95 %信頼区間	98.94 ~	95 %信頼区間	99.53 ~
/ %	100.38	/ %	100.50	/ %	100.93

a) 2-2 用量法における標準液は F により調製した液を, 試料溶液は同じ抽出液を Ba (act.III)により調製した液を用いた.

b) $n = 1$

4 まとめ

飼料分析基準に記載されたポリエーテル系抗生物質 (SL, NR 及び MN) 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 Aluminum oxide Type F-20 (Sigma-Aldrich 製) の同等品として, Aluminium oxide 90 (Merck Millipore 製. ロット番号 : TA 1929376 442) を活性度 III (水分 6 %) に調整したものが適

当と判断した。

文 献

- 1) 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).
- 2) 千原 哲夫，橋本 仁康，進藤 富枝：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，飼料研究報告，32，81-89 (2007).
- 3) Brockmann, H., Schodder, H.: Aluminiumoxyd mit abgestuftem Adsorptionsvermögen zur chromatographischen Adsorption, Chem. Ber., 74, 73 (1941).
- 4) 和光純薬工業：製品詳細情報，活性アルミナ，<http://www.siyaku.com/uh/Shs.do?dspCode=W01W0101-0152>，cited 9 July 2015.