

## 6 ヘイ及びストローキューブ配合の牛用配合飼料中のモネンシンナトリウムに係る飼料分析基準の妥当性確認

坂井田 里子\*, 野村 昌代\*, 橋本 仁康\*

### Validation Study on Monensin Sodium Determination Method for Formula Feed for Cattle Containing Hay and Straw Cube

SAKAIDA Satoko\*, NOMURA Masayo\* and HASHIMOTO Yoshiyasu\*

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

We have made a validation study to determine monensin sodium (MN) in formula feed for cattle, containing hay and straw cubes, using the plate and liquid-chromatograph (LC). These methods have been listed in the Feed Analysis Standard of Japan.

In the plate method, MN was quantified as following: MN in formula feed was extracted with methanol-water (9:1), and the solution was filtered. The filtrate was purified with basic alumina. Then MN concentration was determined by the 2-2 dose method using *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 in F-22 medium.

In the LC method, MN was extracted with methanol-water (9:1), and the solution was filtered. The filtrate was injected into a post-column derivatization LC equipped with a UV-Vis detector (520 nm) to determine the concentration of MN. LC separation was then carried out on ODS column (Mightysil RP-18 GP, 4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Kanto Chemical Co., Inc.; Tokyo, Japan) with methanol-water-acetic acid (94:6:0.1) as a mobile phase, and MN was derivatized by post-column reaction with methanol-sulfuric acid-vanillin (95:2:3, v/v/w).

Recovery tests were conducted using four types of formula feed for cattle, containing hay and straw cubes. Those materials were added with MN according to the following specifications: 15, 22.5, 30 and 45 g(potency)/t for the plate method; 15, 30 and 45 g(potency)/t for the LC method. The resulting mean recoveries ranged as following: 102 % to 118 % for the plate method; 98.6 % to 106 % for the LC method. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub>) was as following; less than 4.5 % for the plate method; less than 3.0 % for the LC method. In the plate method, if the sample collection amount was larger than normal, some samples showed the sign that they were not adequately stirred with the extraction solvent.

Key words: monensin sodium; antibiotic; plate method; liquid-chromatography (LC); formula feed for cattle; hay cube; straw cube

キーワード：モネンシンナトリウム；抗生物質；平板法；液体クロマトグラフィー；牛用配合飼料；ヘイキューブ；ストローキューブ

### 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り、我が国では、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、昭和 53 年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<sup>1)</sup>。

MN は、省令<sup>2)</sup>でブロイラーを除く鶏用（幼すう用・中すう用）及びブロイラー用（前期及び後

\* 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

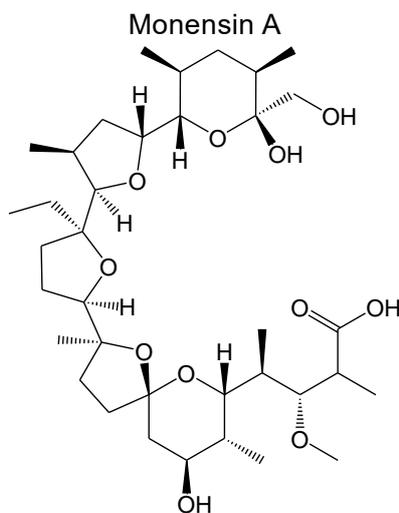
期用) 飼料に 80 g(力価)/t, 牛用 (ほ乳期用, 幼令期用及び肥育期用) 飼料に 30 g(力価)/t 添加することが認められている. なお, 粗砕したヘイキューブを原料とする牛肥育期用飼料については, 均質に混ざりにくいという懸念から MN を含んではならないとされていた<sup>3)</sup>が, 飼料製造事業場からは混合技術や工程管理の向上を踏まえ見直しが要望されていた.

そこで農林水産省からの要請により, 粗砕したヘイ又はストローキューブ (以下「ヘイキューブ等」という.) 配合の牛用配合飼料における MN の定量法として, 農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知<sup>4)</sup>が定める迅速定量法 (吸光光度法) について妥当性確認を実施した結果, 適用可能であると確認された. これにより MN が飼料中に均質に混合されることを工程管理及び品質管理において確認できる事業場においては, ヘイキューブ等を原料とする牛肥育期用飼料に MN を添加することが認められることとなった<sup>5)</sup>.

牛用配合飼料中の MN の定量法としては, 迅速定量法の他に飼料分析基準<sup>6)</sup>に定められた平板法及び液体クロマトグラフ法がある. しかし, 飼料分析基準に記載のこれらの分析法については, 開発時にヘイキューブ等が配合された牛用配合飼料に対する妥当性確認は行われていない<sup>7), 8)</sup>.

そこで, ヘイキューブ等が配合された牛用配合飼料中の MN に係る平板法及び液体クロマトグラフ法の妥当性を確認したので, その概要を報告する.

なお, MN は MN-A, MN-B, MN-C 及び MN-D の混合物であり, 主成分は MN-A である. 参考に MN-A の構造式等を Fig. 1 に示した.



(2S,3R,4S)-4-[(2S,5R,7S,8R,9S)-2-[(2R,5S)-5-ethyl-5-[(2R,3S,5R)-5-[(2S,3S,5R,6R)-6-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-3,5-dimethyloxan-2-yl]-3-methyloxolan-2-yl]oxolan-2-yl]-7-hydroxy-2,8-dimethyl-1,10-dioxaspiro[4.5]decan-9-yl]-3-methoxy-2-methylpentanoic acid

C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>O<sub>11</sub> MW: 670.87 CAS No.: 17090-79-8 (monensin A), 22373-78-0 (monensin Na)

Fig. 1 Chemical structure of MN-A

## 2 実験方法

### 2.1 試料

ヘイキューブ等が配合された, 抗菌性飼料添加物を含まない牛用配合飼料 4 種類について, それぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎されたものを入手し, 分析用試料とし

た. また, 牛用配合飼料 4 に使用されたアルファルファヘイキューブを入手し, 目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機を用いて粉碎し, 検討に用いた.

なお, 検討に用いた配合飼料を Table 1 に示した.

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients <sup>a)</sup>
For cattle 1 (Wheat straw cube: 12 %)	Grains	54	Barley (flake), corn (flake), corn, toasted soybean flour
	Brans	27	Wheat bran, hominy feed, corn gluten feed
	Oil seed meal	4	Soybean meal
	Others	15	Wheat straw (cube), bagasse (chip), alfalfa (pellet), calcium carbonate, salt, feed additives
For cattle 2 (Mixed cube (timothy hay and alfalfa hay): 18 %)	Grains	36	Corn (flake), corn, off-grade wheat flour, barley, wheat
	Oil seed meal	16	Soybean meal, non-enzymatically soybean meal, rapaseed meal
	Brans	13	Corn gluten feed, wheat bran
	Others	35	Timothy hay and alfalfa hay (mixed cube), bagasse (chip), beet pulp, corn cob (pellet), molasses, calcium carbonate, salt, feed additives
For cattle 3 (Alfalfa hay cube: 4 %)	Grains	47	Corn, barley, off-glade wheat flour
	Oil seed meal	20	Soybean meal, rapaseed meal, corn gluten meal
	Brans	19	Wheat bran, soybean hulls
	Others	14	Beat pulp, alfalfa hay (cube), molasses, calcium carbonate, salt, feed additives
For cattle 4 (Alfalfa hay cube: 14 %)	Grains	37	Corn (flake), corn, barley (flake)
	Brans	21	Wheat bran, corn gluten feed, mixed barley bran
	Oil seed meal	8	Soybean meal, rapaseed meal, non-enzymatically soybean meal,
	Others	34	Alfalfa hay (cube), beet pulp, alfalfa (pellet), pineapple bagasse, calcium carbonate, molasses, salt, alfalfa concentrate, feed additives

a) Coarse crushed raw materials and heat-processed raw materials are indicated in brackets after their names.

## 2.2 平板法

### 2.2.1 試薬

1) 試薬は試薬特級を用いた. 水は AQUARIUS RFD240RA (東洋製作所製) により蒸留した蒸留水 (JIS K 0211 の 5213 に定義された蒸留水) を用い, 必要に応じて 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌したものをを用いた.

2) 希釈溶媒

水-メタノール (7+3)

3) MN 標準液

常用標準モネンシン 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 MN 標準原液を調製した. 使用に際して, 標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し, 2 µg(力価)/mL の高濃度標準液及び 0.5 µg(力価)/mL の低濃度標準液を調製した.

4) F-22 号培地

酵母エキスは Bacto Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company 製), カンテンは Bacto Agar (Becton, Dickinson and Company 製) を用い, 飼料分析基準第 9 章第 1 節 1 の A の 3) に従って

調製した。

5) 孢子液

試験菌として *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 を用い、 $1 \times 10^8$  個/mL の孢子液を調製した。

6) 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 0.05 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 15 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。

7) 抽出溶媒

水-メタノール（1+9）

8) 塩基性アルミナ

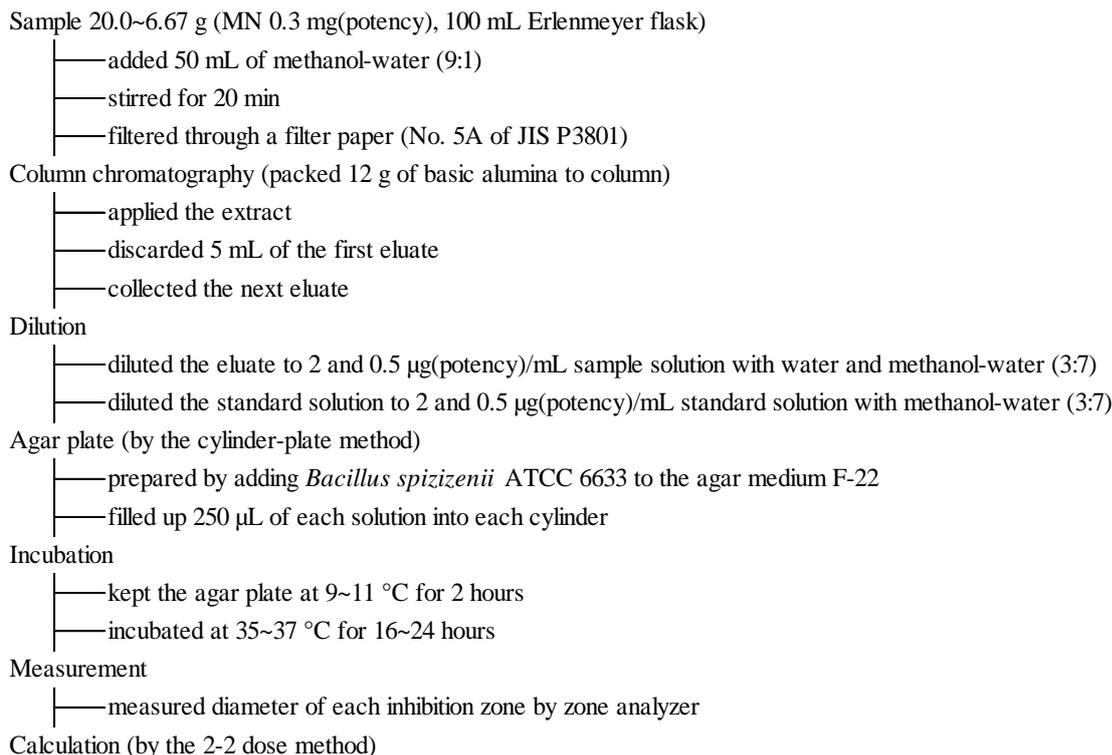
榎本ら<sup>9)</sup>の検討に基づき、カラムクロマトグラフ用塩基性アルミナ（Aluminium oxide 90 active basic Art.1076, Merck 製）を乾燥器にて 130 °C で 2 時間乾燥し、気密容器に入れ、塩基性アルミナ 94 g に対して水 6 mL を加えてよく混和した後、一夜静置し、Brockmann スケール<sup>10)</sup>の活性度 III（水分 6 v/w %）に調整したものを使用した。

### 2.2.2 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM 200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 恒温器：ILE800 ヤマト科学製又は LTI-1001ED 東京理化学器械製
- 3) 阻止円測定装置：ZONE ANALYZER ZA-F システムサイエンス製

### 2.2.3 定量方法

飼料分析基準第 9 章第 2 節 27.2.2 に従った。なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for MN in formula feed (Plate method)

#### 2.2.4 添加回収試験

2.2.1 の 3)の MN 標準原液を添加に用いた。2.2.3 に従った場合の試料量は、MN として 0.3 mg(力価)相当量とされていることから、各分析試料を 20.0, 13.3, 10.0 及び 6.67 g 量り、それぞれに MN として 0.3 mg(力価)相当量 (各分析試料中 15, 22.5, 30 及び 45 g(力価)/t 相当量) を添加後よく混合し、2.2.3 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

#### 2.2.5 添加回収試験 (ヘイキューブの影響確認)

2.2.1 の 3)の MN 標準原液を添加に用いた。試料として 2.1 により調製したアルファルファヘイキューブを使用した。牛用配合飼料 4 を 20.0 g 採取した場合のヘイキューブ含有量である 2.8 g を量り、MN として 0.3 mg(力価)相当量 (牛用配合飼料 4 を 20.0 g 採取した場合の添加濃度 15 g(力価)/t 相当量) を添加後よく混合し、2.2.3 に従って 2 点併行分析を実施し、平均回収率を求めた。

### 2.3 液体クロマトグラフ法

#### 2.3.1 試薬

1) 硫酸は試薬特級、メタノールは液体クロマトグラフ用 (富士フイルム和光純薬製)、酢酸は高速液体クロマトグラフィー用 (関東化学製)、バニリンは鹿特級 (関東化学製) を用いた。水は Direct-Q UV3 (Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。

#### 2) MN 標準液

2.2.1 の 3)で調製した MN 標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中に MN として 0.2 mg(力価) 相当量を含む液体クロマトグラフ法用の MN 標準液を調製した。使用

に際して、液体クロマトグラフ法用の MN 標準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 MN として 0.5, 1, 2.5, 5, 10 及び 15  $\mu\text{g}$ (力価)相当量を含む各 MN 標準液を調製した。

### 3) 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 を加えて溶かしたものを用時調製した。

#### 2.3.2 装置及び器具

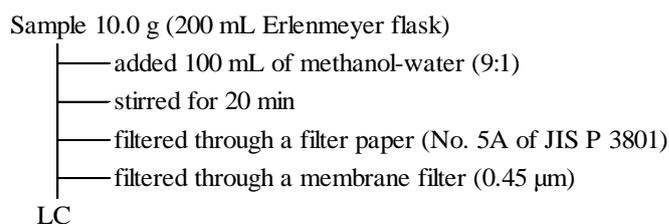
- 1) メンブランフィルター：13HP045AN (孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , 直径 13 mm, PTFE) 東洋濾紙製
- 2) 液体クロマトグラフ：Prominence 島津製作所製

#### 2.3.3 定量方法

飼料分析基準第 9 章第 3 節 1.2 に従った。なお、本報告はピーク面積での結果を記載した。液体クロマトグラフの測定条件を Table 2 に、定量法の概要を Scheme 2 に示した。MN-A, MN-B, MN-C 及び MN-D のうち、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<sup>8)</sup>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、本検討では、MN-A を定量物質とした。

Table 2 Operating conditions of LC

Detector	UV detector (wavelength: 520 nm)
Column	Mightysil RP-18GP (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 $\mu\text{m}$ ), Kanto Chemical
Mobile phase	Methanol-water-acetic acid (94:6:0.1)
Reaction solution	Methanol-sulfuric acid-vanillin (95:2:3, v/v/w)
Flow rate	Mobile phase 0.6 mL/min, Reaction solution 0.6 mL/min
Temperature	Column 40 $^{\circ}\text{C}$ , Reactor 95 $^{\circ}\text{C}$
Reaction coil	0.5 mm i.d. $\times$ 5 m



Scheme 2 Analytical procedure for MN in formula feed (LC method)

#### 2.3.4 添加回収試験

2.2.1 の 3) の MN 標準原液を添加に用いた。各分析試料に、MN として 15, 30 及び 45 g(力価)/t 相当量 (最終試料溶液中で 1.5, 3.0 及び 4.5  $\mu\text{g}$ (力価)/mL) をそれぞれ添加後よく混合し、2.3.3 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

## 3 結果及び考察

### 3.1 平板法

2.2.4 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 2 のとおり、省令<sup>2)</sup>で牛用飼料に添加

することが認められている濃度（以下「成分規格濃度」という。）である 30 g(力価)/t について、平均回収率は 104~108 %，繰返し精度は相対標準偏差（以下「RSD<sub>r</sub>」という。）として 4.5 %以下の成績が得られた。

また、関口らによる検討<sup>11)</sup>と同様に添加濃度 15 及び 45 g(力価)/t についても検討を行った結果、平均回収率は 102~118 %，RSD<sub>r</sub>は 3.1 %以下の成績が得られた。なお、添加濃度 15 g(力価)/t のうち牛用配合飼料 1 については、分析試料に抽出液を加えた際に吸水及び膨張が著しく、かき混ぜが正常に行われなかった。また、添加濃度 15 g(力価)/t のうち、牛用配合飼料 3 及び 4 の回収率が高くなる傾向が認められたことから、ヘイキューブの影響を確認するため、2.2.5 により添加回収試験を実施した。その結果、平均回収率は 106 %であったことから、ヘイキューブによる影響ではないことが確認できた。

なお、農林水産省畜産局長・水産庁長官連名通知<sup>6)</sup>において、管理限界は成分規格濃度の 100 ±25 %としていることから、成分規格濃度の 75 %相当である 22.5 g(力価)/t（試料量 13.3 g）についても添加回収試験を実施した。その結果は、Table 3 のとおり、平均回収率は 103~109 %，RSD<sub>r</sub>は 3.0 %以下の成績が得られた。

Table 3 Recoveries for MN (plate method)

Spiked level (g(potency)/t)	Amount of sample (g)	For cattle 1		For cattle 2		For cattle 3		For cattle 4	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)						
15	20.0	Not extractable		102	2.9	114	3.1	118	2.1
22.5	13.3	109	3.0	109	1.1	108	2.4	103	2.4
30	10.0	107	1.7	104	4.5	107	1.8	108	3.7
45	6.67	104	2.9	105	1.1	107	1.9	104	0.7

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.2 液体クロマトグラフ法

2.3.4 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 4 のとおり、平均回収率は 98.6~106 %，RSD<sub>r</sub>は 3.0 %以下の成績が得られ、飼料分析基準別紙 2 の試験法の妥当性確認ガイドライン（以下「妥当性確認ガイドライン」という。）に定められた 1) 及び 2) の真度及び併行精度の目標値を満たす結果であった。なお、得られたクロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

1) 真度：90 %以上 110 %以下

2) 精度：添加濃度 15 g(力価)/ t : 9.6 %以下，同 30 g(力価)/ t : 9.0 %以下，同 45 g(力価)/ t : 11 %以下

Table 4 Recoveries for MN (LC method)

Spiked level (g(potency)/t)	For cattle 1		For cattle 2		For cattle 3		For cattle 4	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)						
15	103	3.0	106	2.1	105	0.8	98.6	2.1
30	102	2.0	101	1.0	103	0.7	99.1	2.1
45	105	1.2	106	2.0	103	2.0	102	1.4

a) Mean (n = 5)

b) Relative standard deviation of repeatability

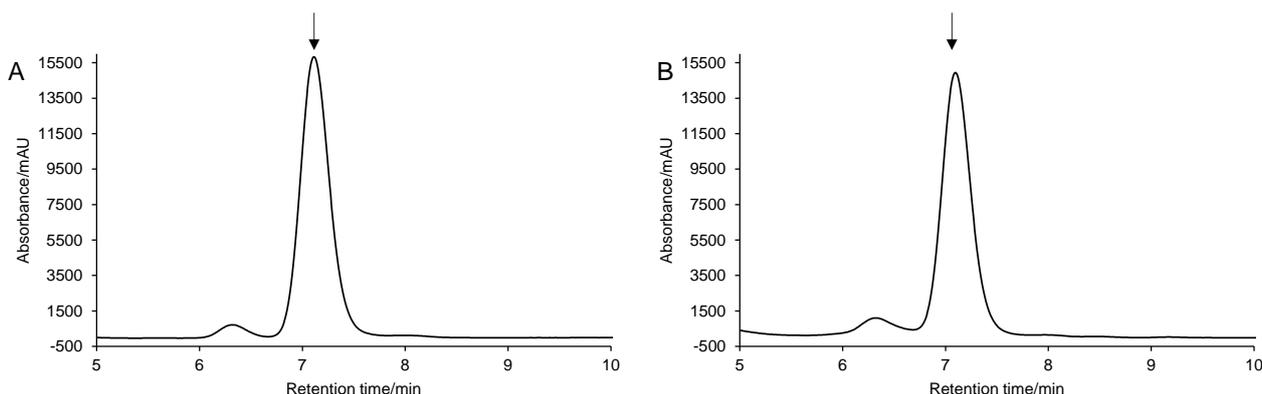


Fig. 2 Typical chromatograms of MN-A derivative in standard and sample solution (LC operating conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention times of MN-A derivative.)

A: Standard solution (5 µg(potency)/mL of MN: 0.1 µg(potency) as injection amount)

B: Sample solution of formula feeds for cattle 2 (spiked at 45 g(potency)/t of MN: 0.09 µg(potency) as injection amount)

#### 4 まとめ

ヘイキューブ等が配合された牛用配合飼料中の MN について、飼料分析基準に記載されている平板法及び液体クロマトグラフ法の妥当性を確認したところ、平板法については分析試料の採取量が多くなることにより、抽出溶媒を加えた際に膨潤等によりかき混ぜ抽出が困難な場合を除き、適用が可能と考えられた。液体クロマトグラフ法については従来の方のままで適用が可能と考えられた。

- 1) 平板法を用いて、MN として牛用配合飼料に 15, 22.5, 30 及び 45 g(力価)/t 相当量を添加し、5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、平均回収率は 102~118 %, RSD<sub>r</sub> は 4.5 % 以下であった。また、15 g(力価)/t 相当量を添加した場合、抽出溶媒によるかき混ぜが正常に行われない試料が認められた。
- 2) 液体クロマトグラフ法を用いて、MN として牛用配合飼料に 15, 30 及び 45 g(力価)/t 相当量を添加し、5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす結果が得られた。

## 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，農林省告示第 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，農林省令第 35 号 (1976).
- 3) 農林水産省畜産局流通飼料課長通知：サリノマイシンナトリウム又はモネンシンナトリウムを含む牛肥育期用飼料の取扱いについて，昭和 61 年 2 月 20 日，61-1 (1986).
- 4) 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 60 年 10 月 15 日，60 畜 B 第 2928 号 (1985).
- 5) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知：抗生物質を含む牛肥育期用配合飼料の製造管理に関する指導について，令和 5 年 6 月 6 日，5 消安第 1415 号 (2023).
- 6) 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，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023).
- 7) 草間 豊子：牛用配合飼料中のモネンシンナトリウムの定量法の検討，飼料研究報告，11，107-123 (1986).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) Brockmann, H. Schodder, H.: Aluminiumoxyd mit abgestuftem Adsorptionsvermögen zur chromatographischen Adsorption, Chem. Ber. 74, 73 (1941).
- 11) 関口 好浩，嶋村 知紗，大島 舞弓，橋本 仁康，奥村 寿章，加藤 まどか，三枝 尚子，千原 哲夫：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，飼料研究報告，41，134-148 (2016).