

第3節 多成分分析法

1 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフによる定量試験法

1.1 プレミックス

- (1) 分析対象抗生物質 SL、SD、NR 及び MN
- (2) 分析法

A 試薬の調製

- 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、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する (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)相当量を含有する。)

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 中にサリノマイシンナトリウムとして 2.5~20 µg(力価)相当量を含有する数点のサリノマイシンナトリウム標準液を調製する。

- 2) センデュラマイシンナトリウム標準液 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標準原液を調製する (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)相当量を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にセンデュラマイシンナトリウムとして 2.5~20 µg(力価)相当量を含有する数点のセンデュラマイシンナトリウム標準液を調製する。

- 3) 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する (この液 1 mL は、ナラシンとして 0.2 mg(力価)相当量を含有する。)

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 中にナラシンとして 0.5~20 µg(力価)相当量を含有する数点のナラシン標準液を調製する。

- 4) 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する (この液 1 mL は、モネンシンナトリウムとして 0.2 mg(力価)相当量を含有する。)

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 中にモネンシンナトリウムとして 2.5~20 µg(力価)相当量を含有する数点のモネンシンナトリウム標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 2~5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水 (9+1) 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出し、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液の一定量をメタノール-水 (9+1) で正確に

希釈した後、メンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

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る。

測定条件 例

検出器：紫外可視吸光光度検出器（測定波長：520 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）^{注1}

溶離液：メタノール-水-酢酸（940+60+1）

反応液^{注2}：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（用時調製する。）。

流速：溶離液 0.6 mL/min、反応液 0.6 mL/min

反応槽温度：95 °C

計算 得られた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、試料中の各抗生物質量^{注3,4}を算出する。

注 1 Mightysil RP-18 GP（関東化学製）又はこれと同等のもの

2 反応槽内の反応コイル（内径 0.5 mm、長さ 5 m（SD の感度が不足する場合には 10 m とする。））、ステンレス製）中で反応液をカラムから溶出した溶離液に合わせて発色させた後、直ちに紫外可視吸光光度検出器に送る。反応液は、遮光容器に入れて使用すること。

3 モネンシンナトリウムについては、算出したモネンシン A 量をモネンシンナトリウム量とする。なお、各モネンシンナトリウム標準液のクロマトグラムに現れる主要なピークが、モネンシン A である。また、試料溶液のクロマトグラムにおいては、標準液のモネンシン A と同じ保持時間に現れるピークがモネンシン A である。

4 ナラシンについては、算出したナラシン A 量をナラシン量とする。なお、各ナラシン標準液のクロマトグラムに現れる主要なピークが、ナラシン A である。また、試料溶液のクロマトグラムにおいては、標準液のナラシン A と同じ保持時間に現れるピークがナラシン A である。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/kg)	繰返 し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
サリノマ	幼すう育成用プレミックス	12.5~85.0	3	99.3~102.1	3.8
イシンナ	プロイラー肥育後期用プレミックス	12.5~85.0	3	96.3~102.7	3.0
トリウム	肉用牛肥育用プレミックス	12.5~85.0	3	98.0~100.8	2.8
センデュ	鶏用プレミックス1	8~42	3	99.8~101.8	2.4
ラマイシ	鶏用プレミックス2	8~42	3	98.5~102.4	2.8
ンナトリ	鶏用プレミックス3	8~42	3	98.2~100.7	2.7
ウム					
ナラシン	鶏用プレミックス1	8~80	3	98.7~103.8	0.9
	鶏用プレミックス2	8~80	3	96.0~99.4	0.8
	鶏用プレミックス3	8~80	3	96.6~99.8	0.5
モネンシ	幼すう育成用プレミックス	5~80	3	98.2~102.4	2.1
ンナトリ	プロイラー肥育後期用プレミックス	5~80	3	101.4~102.5	2.0
ウム	肉用牛肥育用プレミックス	5~80	3	96.6~99.5	4.7

1.2 飼料

(1) 分析対象抗生物質 SL、SD、NR 及び MN

(2) 分析法

A 試薬の調製

1) サリノマイシンナトリウム標準液 1.1 の A によりサリノマイシンナトリウム標準原液を調製する。

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 中にサリノマイシンナトリウムとして 0.5~8 µg(力価)相当量を含む数点のサリノマイシンナトリウム標準液を調製する。

2) センデュラマイシンナトリウム標準液 1.1 の A によりセンデュラマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にセンデュラマイシンナトリウムとして 0.5~10 µg(力価)相当量を含む各センデュラマイシンナトリウム標準液を調製する。

3) ナラシン標準液 1.1 の A による。

4) モネンシンナトリウム標準液 1.1 の A によりモネンシン標準原液を調製する。

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 中にモネンシンナトリウムとして 0.5~15 µg(力価)相当量を含む数点のモネンシンナトリウム標準液を調製する。

B 定 量

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、メタノール-水 (9+1) 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出し、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液をメンブランフィルター (孔径 0.5 µm 以下) で

ろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 1.1 の B の液体クロマトグラフィーの項による。

計 算 1.1 の B の計算の項による。

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

添加成分	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
サリノマイ シンナトリ ウム	幼すう 育成用配合飼料	25~75	3	96.7~101.7	4.6
	ブロイラー 肥育前期用配合飼料	25~75	3	96.0~98.7	2.1
	ブロイラー 肥育後期用配合飼料	25~75	3	97.7~101.3	4.0
	幼令牛 育成用配合飼料	7.5~22.5	3	97.0~100.7	4.6
	肉用牛 肥育前期用配合飼料	7.5~22.5	3	98.3~103.3	4.6
	肉用牛 肥育後期用配合飼料	7.5~22.5	3	97.7~103.0	4.0
センデュ ラマイシ ン	幼すう 育成用配合飼料	12.5~37.5	3	95.6~97.8	1.3
	ブロイラー 肥育前期用配合飼料	12.5~37.5	3	97.5~98.7	1.9
	ブロイラー 肥育後期用配合飼料	12.5~37.5	3	97.7~98.3	1.5
ナラシン	幼すう 育成用配合飼料	40~120	3	97.8~102.2	2.7
	ブロイラー 肥育前期用配合飼料	40~120	3	99.4~102.5	2.7
	ブロイラー 肥育後期用配合飼料	40~120	3	96.3~99.8	1.9
モネンシ ンナトリ ウム	幼すう 育成用配合飼料	40~120	3	99.0~100.3	1.0
	ブロイラー 肥育前期用配合飼料	40~120	3	99.3~99.7	1.2
	ブロイラー 肥育後期用配合飼料	40~120	3	98.7~100.0	1.0
	ほ乳期子牛 育成用配合飼料1	15~45	3	94.4~98.2	2.2
	ほ乳期子牛 育成用配合飼料2	15~45	3	94.9~97.7	2.3
	ほ乳期子牛 育成用配合飼料3	15~45	3	93.3~96.5	2.7
	ほ乳期子牛 育成用配合飼料4	15~45	3	94.9~96.9	1.4
	ほ乳期子牛 育成用配合飼料5	15~45	3	93.8~96.1	1.9
	幼令牛 育成用配合飼料	15~45	3	100.3~102.0	1.2
	肉用牛 肥育用(前期)配合飼料	15~45	3	98.0~99.7	1.7
肉用牛 肥育用(後期)配合飼料	15~45	3	100.7~102.0	1.7	

・ 共同試験

添加成分	試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
サリノマイシンナトリウム	鶏用配合飼料	7	50	94.4	2.7	2.0	0.22
センデュラマイシンナトリウム	ブロイラー後期用配合飼料	7	25	97.9	1.8	1.8	0.18
ナラシン	幼すう育成用配合飼料	7	80	99.7	2.9	2.1	0.25
モネンシンナトリウム	牛用配合飼料	6	30	98.0	2.0	2.6	0.27

2 キタサマイシン、バージニアマイシン及びリン酸タイロシンのバイオオートグラフによる微量定量試験法

- (1) 分析対象抗生物質 KT、VM 及び TS
- (2) 適用範囲 飼料
- (3) 分析法

A 試薬等の調製

- 1) キタサマイシン標準液 常用標準キタサマイシン又はこれと同等のもの 40 mg 以上を正確に量り、メタノール 10 mL を加えて溶かし、更に同溶媒を正確に加えて 1 mg(力価)/mL のキタサマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

- 2) バージニアマイシン標準液 常用標準バージニアマイシン又はこれと同等のもの 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 のバージニアマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

- 3) タイロシン標準液 常用標準タイロシン適量を減圧下 (0.67 kPa 以下)、60 °C で 3 時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、メタノール少量を正確に加えて溶かし、更に 4 号緩衝液を正確に加えて 1 mg(力価)/mL のタイロシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

- 4) 培地 F-111 号培地

- 5) 菌液及び添加量 試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、100 倍希釈した菌液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加える。

- 6) 展開溶媒

i) ヘキサン-酢酸エチル-アセトン-メタノール (4+2+1+1)

ii) アセトニトリル-メタノール (17+3)

- 7) 硫酸ナトリウム (無水) 110~120 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で冷却する。

- 8) 発色試薬 3-(4-ヨードフェニル)-2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウムクロリド 100 mg を水に溶かして 200 mL とする。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料 40.0 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) でろ過する。ろ液 50 mL を 100 mL のなす形フラスコに入れ、50 °C の水浴で減圧乾固した後、クロロホルム-酢酸エチル (9+1) 20 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する。

カラム処理 シリカゲルミニカラム (690 mg) をクロロホルム 10 mL で洗浄する。

硫酸ナトリウム (無水) 約 40 g を入れた漏斗をミニカラムの上に置き、試料溶液を漏斗に入れ、そのミニカラムのリザーバー内の残量が 1 mL に達するまで自然流下させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをクロロホルム-酢酸エチル (9+1) 10 mL で洗浄し、洗液を先の漏斗に加え、同様に 3 回操作する。

先の漏斗中の硫酸ナトリウムをクロロホルム-酢酸エチル (9+1) 10 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加えた後、漏斗をとりはずし、クロロホルム-酢酸エ

チル (9+1) 20 mL をミニカラムに加え、ミニカラムを洗浄する。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、クロロホルム-メタノール (4+1) 30 mL をミニカラムに加えて KT、VM 及び TS を溶出させる。溶出液を 50 °C の水浴で減圧乾固した後、メタノール 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、試料溶液を調製する。

C 定 量

第 1 節 2 の C による。

ただし、薄層板は、シリカゲル薄層板^{注 1}を用い、展開溶媒の上達線が原線から 150 mm の高さに達するまで展開する。

注 1 TLC plate Silica gel 60 (20×20 cm) (Merck 製) 又はこれと同等のものを 110 °C で 2 時間乾燥して用いる。

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
キタマイシン	成鶏用配合飼料	0.1~1	3	97.7~106.0	6.5
	肉豚用配合飼料	0.1~1	3	105.0~113.3	13.5
	乳牛用配合飼料	0.1~1	3	100.0~107.0	8.0
バージニアマイシン	成鶏用配合飼料	0.1~1	3	96.0~106.0	9.1
	肉豚用配合飼料	0.1~1	3	94.7~110.0	9.1
	乳牛用配合飼料	0.1~1	3	100.0~102.3	6.5
リン酸タイロシン	成鶏用配合飼料	0.1~1	3	101.3~106.0	6.5
	肉豚用配合飼料	0.1~1	3	97.7~107.0	9.8
	乳牛用配合飼料	0.1~1	3	98.0~98.7	6.2

・ 検出下限 試料中 各 0.5 g(力価)/t

3 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる微量定量試験法

- (1) 分析対象抗生物質 SL、MN 及び LS
- (2) 適用範囲 飼料
- (3) 分析法

A 試薬等の調製

- 1) サリノマイシン標準液 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、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 のサリノマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。

- 2) モネンシン標準液 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 のモネンシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL

の各標準液を調製する。

- 3) ラサロシド標準液 常用標準ラサロシド 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 のラサロシド標準原液を調製する。
使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、20 µg(力価)/mL、10 µg(力価)/mL、5 µg(力価)/mL、2.5 µg(力価)/mL 及び 1.25 µg(力価)/mL の各標準液を調製する。
- 4) 培地 F-22 号培地
- 5) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^7 個/mL の孢子液を培地 100 mL に対して 0.1 mL 程度加える。
- 6) 展開溶媒
 - i) 酢酸エチル-ヘキサン-アセトン-メタノール (20+8+1+1)
 - ii) 酢酸エチル-アンモニア水 (180+1)
- 7) 硫酸ナトリウム (無水) 110~120 °C で 2 時間乾燥し、デシケーター中で放冷する。
- 8) 発色試薬 3-(4-ヨードフェニル)-2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウムクロリド 100 mg を水に溶かして 200 mL とする。

B 試料溶液の調製

抽出 分析試料 40.0 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) でろ過する。ろ液 50 mL を 100 mL のなす形フラスコに入れ、50 °C の水浴で減圧乾固した後、クロロホルム-酢酸エチル (9+1) 20 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する。

カラム処理 シリカゲルミニカラム (690 mg) をクロロホルム 10 mL で洗浄する。

硫酸ナトリウム (無水) 約 40 g を入れた漏斗をミニカラムの上に置き、試料溶液を漏斗に入れ、そのミニカラムのリザーバー内の残量が 1 mL に達するまで自然流下させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをクロロホルム-酢酸エチル (9+1) 10 mL で洗浄し、洗液を先の漏斗に加え、同様に 3 回操作する。

先の漏斗中の硫酸ナトリウムをクロロホルム-酢酸エチル (9+1) 10 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加えた後、漏斗をとりはずし、クロロホルム-酢酸エチル (9+1) 20 mL をミニカラムに加え、ミニカラムを洗浄する。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、クロロホルム-メタノール (4+1) 30 mL をミニカラムに加えて SL、MN 及び LS を溶出させる。溶出液を 50 °C の水浴で減圧乾固した後、メタノール 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、試料溶液を調製する。

C 定 量

第 1 節 2 の C による。

ただし、薄層板はシリカゲル薄層板^{注 1} を用い、展開溶媒の上達線が薄層板の上端に達するまで展開する。

注 1 TLC plate Silica gel 60 (20×20 cm) (Merck 製) 又はこれと同等のものを

110 °C で 2 時間乾燥して用いる。

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
サリノマイシン ンナトリウム	成鶏用配合飼料	0.1~1	3	102.0~110.0	8.9
	肉豚用配合飼料	0.1~1	3	106.7~120.0	8.3
	乳牛用配合飼料	0.1~1	3	104.7~116.7	9.9
モネンシンナ トリウム	成鶏用配合飼料	0.1~1	3	97.3~106.7	5.4
	肉豚用配合飼料	0.1~1	3	99.3~106.0	11.5
	乳牛用配合飼料	0.1~1	3	98.7~110.0	5.2
ラサロシドナ トリウム	成鶏用配合飼料	0.1~1	3	94.0~116.0	18.6
	肉豚用配合飼料	0.1~1	3	91.3~112.0	21.7
	乳牛用配合飼料	0.1~1	3	94.7~112.0	21.7

・ 検出下限 試料中 各 0.5 g(力価)/t

4 ポリエーテル系抗生物質の液体クロマトグラフ質量分析計による微量定量試験法

- (1) 分析対象抗生物質 SL、SD、NR、MN 及び LS (5 成分)
- (2) 適用範囲 配合飼料
- (3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) 各抗生物質標準原液 常用標準サリノマイシン^{注1}、常用標準センデュラマイシン、常用標準ナラシン、常用標準モネンシン及び常用標準ラサロシド各 20 mg(力価)相当量を正確に量って、それぞれ 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各標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、それぞれ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 0.2 mg(力価)相当量を含有する。）。
- 2) 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ラサロシドナトリウム標準原液の一定量を混合し、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 0.1~2 µg(力価)相当量を含有する数点の混合標準液を調製する。

B 定 量

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) でろ過する。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する。

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する。

カラム処理 シリカゲルミニカラム (690 mg) 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く。

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る。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、同様に流下させる。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、洗浄する。

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る。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する。

メタノール 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、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する。

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、選択イオン検出クロマトグラムを得る。

測定条件例

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm）^{注2}

溶離液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル（1+4）

流速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

検出器：四重極型質量分析計^{注3}

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（正イオンモード）

ネブライザーガス：N₂（1.5 L/min）

C D L 温度：250 °C

ヒートブロック温度：200 °C

モニターイオン：*m/z* 769（サリノマイシン）
m/z 891（センデュラマイシン）
m/z 783（ナラシン A）
m/z 688（モネンシン A）
m/z 608（ラサロシド）

計算 得られた選択イオン検出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、試料中の各抗生物質量^{注4}を算出する。

注 1 適量を減圧下（0.67 kPa 以下）、60 °C で3時間乾燥したもの

2 Gemini 5µ C18 110A（Phenomenex 製、本測定条件によるサリノマイシン、センデュラマイシン、ナラシン A、モネンシン A 及びラサロシドの保持時

間は、それぞれ約 9 分、約 6 分、約 13 分、約 8 分及び約 4 分) 又はこれと同等のもの

3 LCMS-2010EV (島津製作所製) による条件例

4 ナラシンについては、算出したナラシン A 量をナラシン量とする。また、モネンシンについては、算出したモネンシン A 量をモネンシンナトリウム量とする。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分	試料の種類	添加濃度 (g(力価)/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
サリノマイシン ナトリウム	成鶏飼育用配合飼料	0.5~5	3	95.0~96.2	2.4
	肉豚肥育用配合飼料	0.5~5	3	95.5~98.4	2.3
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5~5	3	89.7~98.8	2.9
センデュラマイシン ナトリウム	成鶏飼育用配合飼料	0.5~5	3	89.4~89.5	1.2
	肉豚肥育用配合飼料	0.5~5	3	80.0~84.6	10
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5~5	3	88.7~90.0	3.9
ナラシン	成鶏飼育用配合飼料	0.5~5	3	86.8~88.9	7.6
	肉豚肥育用配合飼料	0.5~5	3	83.0~88.3	6.6
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5~5	3	83.4~89.7	13
モネンシン ナトリウム	成鶏飼育用配合飼料	0.5~5	3	104.3~108.7	1.5
	肉豚肥育用配合飼料	0.5~5	3	104.1~104.5	0.9
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5~5	3	103.7~107.5	1.1
ラサロシド ナトリウム	成鶏飼育用配合飼料	0.5~5	3	91.6~94.5	2.8
	肉豚肥育用配合飼料	0.5~5	3	86.0~91.4	4.5
	肉用牛肥育用配合飼料	0.5~5	3	85.2~89.4	3.8

・共同試験

分析成分名	試料の種類	試験 室数	添加濃度 (g(力 価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _i (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
サリノマイシン ナトリウム	成鶏飼育用 配合飼料	8	0.5	95.0	2.7	6.4	0.36
センデュラマイシン ナトリウム	成鶏飼育用 配合飼料	8	0.5	98.6	2.6	8.0	0.45
ナラシン	成鶏飼育用 配合飼料	8	0.5	88.5	3.5	5.7	0.31
モネンシン ナトリウム	成鶏飼育用 配合飼料	8	0.5	101.0	3.6	5.0	0.28
ラサロシド ナトリウム	成鶏飼育用 配合飼料	8	0.5	93.3	3.8	8.2	0.46

・検出下限 試料中 0.5 g(力価)/t

5 ポリエーテル系抗生物質のバイオオートグラフによる確認試験法

5.1 プレミックス

(1) 確認対象抗生物質 SL、MN 及び LS

(2) 分析法

A 試薬等の調製

1) サリノマイシン標準液 3 の A の 1)により 1 mg(力価)/mL のサリノマイシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、10 µg(力価)/mL の標準液を調製する。

2) モネンシン標準液 3のAの2)により1 mg(力価)/mLのモネンシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、10 µg(力価)/mLの標準液を調製する。

3) ラサロシド標準液 3のAの3)により1 mg(力価)/mLのモネンシン標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、10 µg(力価)/mLの標準液を調製する。

4) 培地 F-22号培地

5) 孢子液及び添加量 試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、 1×10^7 個/mLの孢子液を培地100 mLに対して0.2 mL程度加える。

6) 抽出溶媒 メタノール-水 (9+1) (LSにあってはメタノール)

7) 展開溶媒 酢酸エチル-ヘキサン-アセトン-メタノール (20+8+1+1)

8) 発色試薬 3-(4-ヨードフェニル)-2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウムクロリド100 mgを水に溶かして200 mLとする。

B 試料溶液の調製

分析試料3~5 gを正確に量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒100 mLを加え、20分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙(5種A)でろ過する。

ろ液の一定量を抽出溶媒で正確に希釈し、10 µg(力価)/mLの試料溶液を調製する。

C 同 定

第1節2のCの薄層クロマトグラフィー、寒天平板の調製、培養及び同定の項による。

ただし、薄層板はシリカゲル薄層板^{注1}を用い、標準液及び試料溶液各25 µLをスポットし、展開溶媒の上達線が薄層板の上端に達するまで展開する。

注1 TLC plate Silica gel 60 (20×20 cm) (Merck製)又はこれと同等のものを110 °Cで2時間乾燥して用いる。

5.2 飼料

(1) 確認対象抗生物質 SL、MN及びLS

(2) 分析法

A 試薬等の調製

5.1の(2)のAによる。

B 試料溶液の調製

分析試料の一定量(SL若しくはMNとして0.5 mg(力価)相当量又はLSとして1 mg(力価)相当量)を正確に量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒50 mL(LSにあってはクロロホルム100 mL)を加え、20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、10 µg(力価)/mLの試料溶液を調製する。

C 同 定

5.1 の(2)の C による。