

2 配合飼料中のフラボフォスホリポールの微生物学的定量法の検討

野村 昌代^{*1}, 大島 慎司^{*1,2}, 鈴木 時也^{*1}, 時田 佳奈^{*3},
梁川 璃胡^{*1}, 山多 晴子^{*1}, 野崎 友春^{*1}

Study of Flavophospholipol Determination Method in Formula Feed by Microbiological Assay

NOMURA Masayo^{*1}, OSHIMA Shinji^{*1,2}, SUZUKI Tokiya^{*1}, TOKITA Kana^{*3}, YANAGAWA Riko^{*1},
YAMATA Seiko^{*1} and NOZAKI Tomoharu^{*1}

(^{*1} Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),

^{*2} Institute of Food Research, National Agriculture and Food Research Organization, ^{*3} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Current affiliation: Sendai Regional Center, FAMIC))

A quantitative determination method using microbiological assays was studied to determine the concentration of flavophospholipol (FV) in formula feed.

After mixing a sample with hexane, FV was extracted by adding 0.01 mol/L sodium hydroxide solution-acetone (1:1). The extract was diluted with buffer No. 7, and the pH was adjusted to 6.9-7.1. The FV in the diluted solution was purified by a phospholipid removal column and determined by the standard curve method using *Bacillus cereus* ATCC 19637 in F-19 medium.

Results of the recovery test (adding standard solution) of two types of formula feed for growing period broiler and one type for finishing period broiler showed a recovery rate of over 90 %. Results of the other recovery test (adding the preparation) tended to be different from the recovery test in which the standard solution was added. Moreover, the recovery rate with the preparation greatly differed by the difference of the spiked level. Therefore, it was considered that further examination of the analytical method was necessary.

Key words: flavophospholipol; microbiological assay; plate method; formula feed

キーワード：フラボフォスホリポール；微生物学的定量法；平板法；配合飼料

1 緒 言

フラボフォスホリポール（以下「FV」という。）は、*Streptomyces* 属の 4 種の細菌（*Streptomyces bambergiensis*, *Streptomyces ghanaensis*, *Streptomyces geysiriensis* 及び *Streptomyces ederenis*）により産生される含リン多糖類系の抗生物質で¹⁾、化学式は $C_{65-75}H_{124-135}N_{6-7}O_{40-42}P$ の分子式を有する複数の成分の複合体であり、構造が未確定の成分を含む²⁾。主要な成分はモエノマイシン A で、他にモエノマイシン A₁₂, C₁, C₃, C₄ 等を含むが²⁾、これらの構成比は不明である。FV の製造用原体の理化学的性状は、褐色～暗褐色の粉末で、特異なおいを有し、メタノールにわずかに溶けるほかは、ほとんどの溶媒に溶けない。また、酸性又は塩基性溶液中では不安定で、pH 7~9 の場合に安定である。FV は、主としてグラム陽性菌に対して強い抗菌作用を有し、鶏（ブロイラーを含む）及び豚に対して成長促進効果がある。作用機序は、細菌の細胞壁の生合成阻害と考えられている¹⁾。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

^{*1} 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

^{*2} 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門

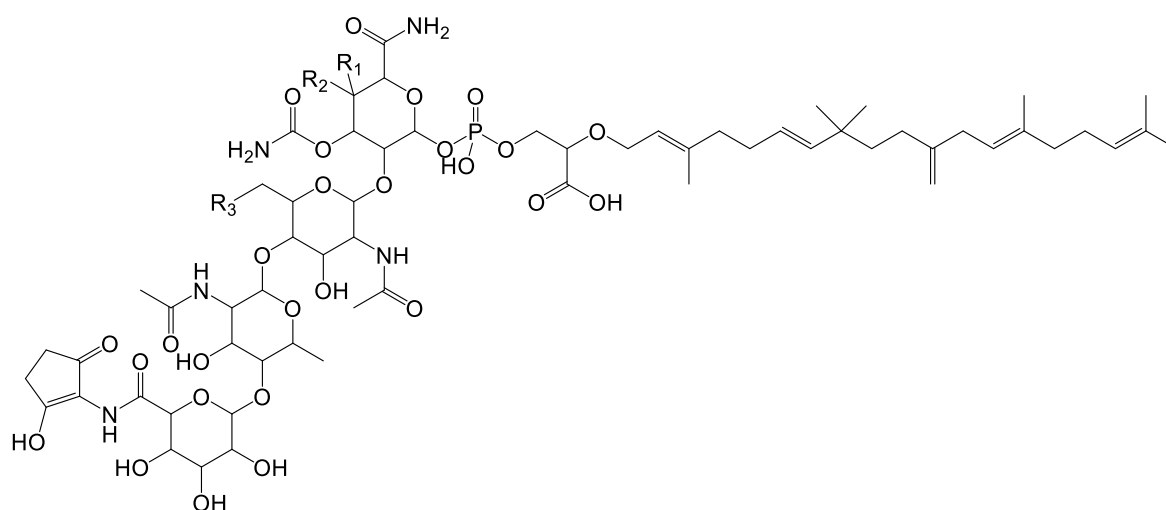
^{*3} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 仙台センター

51 年に飼料添加物として指定された³⁾。FV を含むことができる飼料の種類及び量は、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令⁴⁾（以下「省令」という。）により、ブロイラーを除く鶏用（幼すう用及び中すう用）及びブロイラー用（前期用及び後期用）で 1~5 g(力価)/t、豚用（ほ乳期用）で 2~10 g(力価)/t、豚用（子豚期用）で 2.5~5 g(力価)/t と規定されている。

近年、国内において FV を添加した配合飼料は流通しており、配合飼料の原材料として使用するプレミックスについては FV 定量法が飼料分析基準⁵⁾に定められている。しかし、配合飼料中の分析方法については、検討は試みられたものの、未だ確立されていない。抗菌性飼料添加物を含む配合飼料の適切な製造管理には、定量可能な分析方法の確立が不可欠である。

そこで、一般財団法人生物科学安全研究所が令和 5 年に生産資材安全確保対策委託事業において開発した配合飼料中の FV の分析法（以下「RIAS 法」という。）⁶⁾等を基に、ブロイラー前期用及び後期用配合飼料を対象に飼料分析基準への収載の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考に FV の構造式等を Fig. 1 に示した。



	R ₁	R ₂	R ₃
Moenomycin A	CH ₃	OH	Glucosyl
Moenomycin A ₁₂	OH	H	Glucosyl
Moenomycin C ₁	OH	H	H
Moenomycin C ₃	CH ₃	OH	H
Moenomycin C ₄	CH ₃	OH	OH

Flavophospholipol (FV)

C₆₅₋₇₅H₁₂₄₋₁₃₅N₆₋₇O₄₀₋₄₂P

Fig. 1 Chemical structures of FV

2 実験方法

2.1 試料

1) 配合飼料

抗菌性飼料添加物を含まないブロイラー前期用 2 種類及びブロイラー後期用 1 種類を、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し、添加回収試験用（標準液添加）等

の分析用試料とした。なお、検討に用いた配合飼料を Table 1 に示した。

- 2) FV 製剤：Huvepharma 製（含有量 80 g(力価)/kg，賦形物質等：炭酸カルシウム，ケイ酸マグネシウム，ケイソウ土，クエン酸，ジブチルヒドロキシトルエン，食塩，リン酸二水素カルシウム，没食子酸プロピル，コーンコブミール，エトキシキン及び二酸化ケイ素）

- 3) 希釈剤

添加回収試験用試料調製の希釈剤として米ぬか油かすを用いた。

- 4) 添加回収試験用（製剤添加）の分析用試料

乳鉢を用いて 2)の FV 製剤を 3)の希釈剤と混合して，FV として 8 mg(力価)/g の希釈試料を調製し，これを用いて，さらに 0.8 mg(力価)/g の希釈試料を調製した。V 型混合機（筒井理化学器械製）で希釈試料と 1)のブロイラー前期用 1 を混合し，FV としてそれぞれ 1.5 g(力価)/t 及び 7.5 g(力価)/t 含有する試料を調製した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For growing period broiler 1	Grains	61	Corn, milo
	Oil seed meal	29	Soybean meal, corn gluten meal
	Animal by-products	4	Fish meal
	Others	6	Animal fat, calcium phosphate, calcium carbonate, salt, feed additives
For growing period broiler 2	Grains	57	Corn, brown rice
	Oil seed meal	31	Soybean meal, corn gluten meal, rapeseed meal
	Animal by-products	4	Fish meal
	Brans	1	Defatted rice bran
	Others	7	Plant fat, calcium phosphate, calcium carbonate, salt, feed additives
For finishing period broiler	Grains	65	Corn, milo, brown rice
	Oil seed meal	24	Soybean meal, corn gluten meal
	Animal by-products	4	Fish meal
	Others	7	Animal fat, calcium phosphate, calcium carbonate, salt, feed additives

2.2 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用いた。

- 2) 7 号緩衝液

飼料分析基準第 9 章第 1 節 1 の A の 1)の vii)に従って調製した。

- 3) 希釈溶媒

7 号緩衝液－アセトン（3+1）を調製した後，リン酸（5 mol/L 及び 1 mol/L）で pH を 6.9~7.1 に調整した。

4) FV 標準液

常用標準 FV 40 mg 以上を正確に量り，メタノール-水（1+1）を正確に加えて溶かし，1 mg(力価)/mL の FV 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，0.8, 0.4, 0.2, 0.1 及び 0.05 µg(力価)/mL（1 g(力価)/t 以外の添加回収試験の際に使用）又は 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 及び 0.025 µg(力価)/mL（1 g(力価)/t の添加回収試験の際に使用）の組み合わせの各標準液を調製した．なお，参照標準液は，用いた標準液 5 濃度の中央の濃度とした．

5) F-19 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．

6) 孢子液

試験菌として *Bacillus cereus* ATCC 19637 を用い， 1×10^6 個/mL の孢子液を調製した．

7) 寒天平板

高圧蒸気滅菌した後，49~51 °C に保温した F-19 号培地に，孢子液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加えて十分にかき混ぜ，その 20 mL をプラスチック製滅菌シャーレ（内径 90 mm，高さ 20 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．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，せん孔機を用いて 4 個のせん孔（内径 8 mm）を設けた．

8) 抽出溶媒

0.01 mol/L 水酸化ナトリウム溶液-アセトン（1+1）

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) リン脂質除去ミニカラム：InertSep Phospholipid Remover（100 mg/3 mL）ジーエルサイエンス製
- 3) メンブランフィルター：13HP045AN（孔径 0.45 µm，直径 13 mm，親水性 PTFE）東洋濾紙製
- 4) 恒温器：LTI-1001ED 東京理化器械製又は ILE800 ヤマト科学製
- 5) 阻止円測定装置：ProtoCOL3HD Synoptics 製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 5 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ，ヘキサン 15 mL を加え，2~3 分間かき混ぜた．更に抽出溶媒 50 mL を加えて混和し，試料溶液の pH が 7~9 の範囲外であった場合，少量の水酸化ナトリウム溶液（5 mol/L 及び 1 mol/L）で pH 7~9 の範囲に調整した後，20 分間かき混ぜて抽出した．抽出液の全量を 100 mL のガラス製共栓遠心沈殿管に入れ，1500×g で 5 分間遠心分離した．遠心分離後，下層 25 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ，全量フラスコの標線を超えない範囲で 7 号緩衝液を加えて，リン酸（5 mol/L 及び 1 mol/L）で pH を 6.9~7.1 に調整した後，更に標線まで 7 号緩衝液を加えた．試料溶液をろ紙（5 種 A）でろ過した後，参照標準液の濃度である 0.2 µg(力価)/mL を超える場合は，希釈溶媒で 0.2

μg(力価)/mL となるように希釈し、カラム処理に供する試料溶液とした（本検討においては、FV として 7.5 g(力価)/t 含有する試料の試料溶液のみ希釈を行った。）。

2) カラム処理

試料溶液 10 mL をリン脂質除去ミニカラムに入れ、3 mL/min 程度の流速になるよう吸引した。10 mL の試験管をカラムの下に置き、初めの流出液 2 mL を捨て、別の 10 mL の試験管をカラムの下に置き、その後の流出液 4 mL を受けた。流出液をメンブランフィルターでろ過し、試料溶液を調製した。

3) 分注及び培養

2.2 の 7) で調製した寒天平板を用い、飼料分析基準の標準曲線法に準じ、標準液及び試料溶液をそれぞれ 100 μL ずつ、各せん孔に分注し、9~11 °C で 2 時間静置した後、27~29 °C で 16~24 時間培養した。

4) 阻止円直径の測定及び計算

阻止円測定装置又はノギスを用い、培養を終えた寒天平板上の阻止円の直径をそれぞれ 0.25 mm まで正確に測定し、飼料分析基準の標準曲線法に準じ、試料中の FV 濃度を求めた。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Sample 5 g (200 mL Erlenmeyer flask)

- added 15 mL of hexane
- stirred for 2~3 min
- added 50 mL of 0.01 mol/L sodium hydroxide solution-acetone (1:1)
- adjusted pH 7~9
- stirred for 20 min

Extract (100 mL centrifuge tube)

- centrifuged at 1500×g for 5 min

Lower layer 25 mL (50 mL volumetric flask)

- adjusted pH 6.9~7.1
- filled up 50 mL with buffer No. 7
- filtered through filter paper (No. 5A of JIS P 3801)
- diluted to 0.2 μg(potency)/mL with buffer No. 7-acetone (3:1) (pH 6.9~7.1) (If more than 0.2 μg(potency)/mL)

InertSep Phospholipid Remover (100 mg/3 mL)

- applied sample solution
- discarded the first 2 mL of the eluate
- collected the following 4 mL of the eluate
- filtered through membrane filter (PTFE 0.45 μm)

Filtrate and standard solutions (prepared each standard solution by diluting with dilution solvent)

- prepared agar plate by adding *Bacillus cereus* ATCC 19637 to the agar medium F-19 (agar well method)
- dispensed 100 μL of each solution into each agar well
- kept the agar plate at 9~11 °C for 2 hours
- incubated at 27~29 °C for 16~24 hours
- measured diameter of each inhibition zone by zone analyzer

Calculation (by standard response line method)

Scheme 1 Analytical procedure for FV in feed

2.5 添加回収試験（標準液添加）

2.2 の 4) の FV 標準原液の一定量をメタノール-水（1+1）で正確に希釈し、100 µg(力価)/mL の標準液を調製して添加に用いた。各分析試料に FV として 1 g(力価)/t（最終試料溶液中で 0.05 µg(力価)/mL）又は 2 g(力価)/t（同 0.1 µg(力価)/mL）相当量を添加し、よく混合した後、2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

2.6 予備添加回収試験（標準液添加）（RIAS 法（ブロイラー後期用の方法））

RIAS 法において、試料量は FV として 20 µg(力価)相当量を量りとりとされていることから、2.1 の 1) のブロイラー後期用 20 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、20 µg(力価)相当量（分析試料中 1 g(力価)/t 相当量）の FV 標準液を 2.5 に従って添加後、0.0075 mol/L 水酸化ナトリウム溶液-アセトン（1+1）を 50 mL 加え、10 分間振り混ぜ、更に 10 分間超音波処理を行って抽出した。抽出液を 50 mL のポリプロピレン製共栓遠心沈殿管に移し、8000×g で 10 分間遠心分離した。遠心分離後の上澄み液を脱脂綿を詰めた漏斗でろ過して、ろ液を 100 mL のビーカーに入れた。遠心分離後の残さを先の 300 mL の共栓三角フラスコに戻し、同様の操作で 2 回目の抽出を行い、得られたろ液を先のビーカーに合わせた。ろ液全量を 300 mL の分液漏斗に入れ、酢酸エチル 60 mL を加えて 5 分間振り混ぜ、静置した。下層を 100 mL の全量フラスコに入れ、標線まで 7 号緩衝液を加え、0.2 µg(力価)/mL の試料溶液を調製し、以降は 2.4 の 3) に従って定量した。なお、FV 標準液については、2.2 の 4) の 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 及び 0.05 µg(力価)/mL の組み合わせの各標準液を用いた。

2.7 メンブランフィルターによるろ過の影響の比較（添加回収試験（標準液添加））

ブロイラー後期用 5 g を量って、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、FV 標準液を 2.5 に従って添加後、2.4 の 1) に従い操作した。遠心分離後の下層 25 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ、全量フラスコの標線を超えない範囲で 7 号緩衝液を加え、リン酸（5 mol/L 及び 1 mol/L）で pH を 6.9~7.1 に調整した後、更に標線まで 7 号緩衝液を加えた。その後、試料溶液をろ紙（5 種 A）でろ過したもの（メンブランフィルター無）と、更にメンブランフィルターでろ過したもの（メンブランフィルター有）を調製し、以降は 2.4 の 3) に従って定量した。

2.8 添加回収試験（製剤添加）（溶媒変更）

2.2 の 3) の希釈溶媒を 7 号緩衝液-メタノール（3+1）（pH 6.9~7.1 に調整）に、2.2 の 8) の抽出溶媒をメタノール-水（1+1）に変更し、2.1 の 4) に従って製剤を添加したブロイラー前期用 1 を用いて 2.4 に従って定量した。

3 結果及び考察

3.1 予備添加回収試験（標準液添加）（RIAS 法（ブロイラー後期用の方法））

RIAS 法は、配合飼料の種類により分析法が分かれているが、そのうち、ブロイラー後期用の方法を用いて、2.6 により予備添加回収試験を実施した。その結果、回収率が 60 %を下回った。その理由として、遠心分離後の沈殿物に流動性が認められたことから、抽出液と沈殿物の分離が不十分であり、沈殿物に FV が残存しているために回収率が低い可能性が考えられた。そこで、改善のため、抽出後の操作について、遠心分離を行う方法から、5 種 A のろ紙を敷いたブフナー漏斗にて吸引ろ過する方法に変更するとともに、試料量を 10 g 及び 5 g に変更して再度予備添加回収試験を実施した。その結果、試料量を 10 g に変更した場合では回収率が 80 %台、5 g に変更

した場合では回収率が 90 % 台になった。

試料量を減らすことによりマトリックスの影響が小さくなり、回収率が改善したと考えられたが、試料量を 5 g 未満に減らすと、分析試料中に含まれる FV の量も減少するため、阻止円が小さくなり定量不可となる可能性が考えられた。また、脱脂のため酢酸エチルを加えて振り混ぜる操作により、試料溶液の一部が酢酸エチル層へ移行し試料溶液が濃縮されること、試料量を FV として 20 μg (力価)相当量とすると 2~20 g と幅があるために、試料が抽出液を吸収する量にも差が生じ、最終試料溶液の溶媒組成が標準液の組成（7 号緩衝液－アセトン（3+1））と異なることへの懸念も生じた。

そのため、FV と同じ含リン多糖類系の抗生物質であるマカルボマイシンの飼料分析基準収載の飼料中の定量方法等を参考に、抽出溶媒を 0.0075 mol/L 水酸化ナトリウム溶液－アセトン（1+1）から 0.01 mol/L 水酸化ナトリウム溶液－アセトン（1+1）へ変更し、酢酸エチルでの液液分配による脱脂から、抽出時にヘキサンを用いる脱脂方法に変更した。加えて、試料量を固定とし、かき混ぜて抽出し、遠心分離を行った後、下層をろ紙でろ過する方法に変更して検討を行うこととした。また、最終試料溶液の pH を標準液の pH と揃えるため、抽出後の試料溶液を 50 mL に定容する際に、pH 6.9~7.1 に調整する操作を追加した。

以上の操作により試料溶液を調製したところ、ろ紙によるろ過後の試料溶液が白濁した。その改善のため、2.7 に従ってメンブランフィルターによるろ過の影響を確認した結果、試料溶液の白濁は解消し、Table 2 のとおり回収率が向上したことから、メンブランフィルターによるろ過を追加することとした。

Table 2 Results comparing with and without filtration by membrane filter

Spiked level (g(potency)/t)	Membrane filter	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
1	Without membrane filter	88.6	7.6
	With membrane filter	98.0	0.26

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.2 添加回収試験（標準液添加）

2.4 の 1) にて得られた試料溶液をメンブランフィルターでろ過し、2.4 の 3) に従い、添加回収試験を 3 点併行にて実施した。試料は 2.5 に従って FV として 1 g(力価)/t 相当量（最終試料溶液中 0.05 μg (力価)/mL）を添加したブロイラー前期用 1、2 及び後期用を用いた。その結果は、Table 3 のとおり、平均回収率はブロイラー前期用 1 が 102 %、ブロイラー前期用 2 が 116 %、ブロイラー後期用が 98.0 % であった。

ブロイラー前期用 2 が 110 % を超える高い回収率であったことから、改善のため、リン脂質除去ミニカラムの使用を検討した。ブロイラー前期用 2 に 2.5 に従って FV として 2 g(力価)/t 相当量（同 0.1 μg (力価)/mL）を添加した後、2.4 の 1) に従って抽出した試料溶液 10 mL をリン脂質除去ミニカラムに入れ、流出液を 2 mL ずつ採取して、各流出液をメンブランフィルターでろ過し、各画分の FV 回収率を確認した。その結果は Table 4 のとおり、流出液 0~2 mL の画分における回収率は 123 % と高く、2 mL 以降の画分における回収率は 92.7~97.5 % と良好な結果であった。ミ

ニカラムに供する試料液量が増えるほど、ミニカラムにおいて夾雑物を除去しきれなくなる懸念があったため、試験に用いるのに必要十分な量のみを採取することとし、初めの流出液 2 mL を捨て、その後の 4 mL を用いることとした。

ブロイラー前期用 1, 2 及び後期用を用い、2.5 に従って FV として 2 g(力価)/t 相当量 (同 0.1 µg(力価)/mL) を添加し、2.4 に従い、添加回収試験を 3 点併行にて実施した。その結果は、Table 5 のとおり、回収率の改善が認められたため、リン脂質除去ミニカラムによる精製を追加することとした。

Table 3 Recoveries for FV without phospholipid removal columns
(addition of FV standard solution)

Spiked level (g(potency)/t)	Phospholipid removal column	For growing period broiler 1		For growing period broiler 2		For finishing period broiler	
		Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	Without column	102	5.1	116	3.9	98.0	0.26

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 4 Elution pattern of FV from phospholipid removal columns

Target	Recovery (%)				
	0~2 mL	2~4 mL	4~6 mL	6~8 mL	8~10 mL
FV	123	92.7	93.5	96.0	97.5

$n = 1$

Table 5 Recoveries for FV with phospholipid removal columns (addition of FV standard solution)

Spiked level (g(potency)/t)	Phospholipid removal column	For growing period broiler 1		For growing period broiler 2		For finishing period broiler	
		Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
2	With column	91.2	4.5	94.5	1.5	98.2	4.1

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.3 添加回収試験 (製剤添加)

2.1 の 4)に従って製剤を添加した分析用試料を用いて添加回収試験を実施した。

FV として 7.5 g(力価)/t (最終試料溶液中で 0.2 µg(力価)/mL) 含有するブロイラー前期用 1 を 2.4 に従って定量したところ、回収率が 70 %台と低い回収率であった。改善のため、省令で規定されている FV の製剤の力価試験を参考に、2.8 のとおり、抽出溶媒及び希釈溶媒をアセトン含有からメタノール含有へ変更し、FV として 1.5 g(力価)/t (同 0.075 µg(力価)/mL) 及び 7.5 g(力価)/t 含有するブロイラー前期用 1 を定量した。その結果、7.5 g(力価)/t の回収率は 90 %台へ改善したが、1.5 g(力価)/t の回収率が 150 %台となった。標準液添加による添加回収試験と異なる傾

向となり、更に、添加濃度の違いにより回収率が大きく異なる結果となったことから、分析法の更なる検討が必要であると考えられた。

4 まとめ

配合飼料中の FV の定量法について、RIAS 法を基に飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られ、分析法の更なる検討が必要であると考えられた。

- 1) RIAS 法にて、予備的に添加回収試験（標準液添加）を行ったところ、マトリックスの影響を受け、回収率が低くなる可能性等が示唆された。
- 2) 飼料分析基準収載の飼料中のマカルボマイシンの定量法等を参考に、RIAS 法の改良を試みたところ、ろ紙によるろ過後の試料溶液が白濁した。メンブランフィルターによるろ過を追加することで、白濁は解消し、添加回収試験（標準液添加）の回収率が向上したが、一部の試料において、110 %を超える高い回収率となった。更に、リン脂質除去ミニカラムによる精製を追加することで、回収率が改善した。
- 3) マカルボマイシンの定量法を参考に改良した方法（本法）にて、7.5 g(力価)/t での添加回収試験（製剤添加）を行った結果は、70 %台と低い回収率となった。改善のため、省令で規定されている FV の製剤の力価試験を参考に、抽出溶媒及び希釈溶媒をアセトン含有からメタノール含有へ変更した。その添加回収試験（製剤添加）の結果、回収率は 90 %台へ改善したが、1.5 g(力価)/t の回収率が 150 %台となった。製剤添加の添加回収試験の結果は、標準液添加による添加回収試験結果と異なる傾向となり、更に、添加濃度の違いにより回収率が大きく異なる結果となった。

文 献

- 1) Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F.: Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria, Clin. Microbiol. Rev. 16, 175–188 (2003).
- 2) Zehl M, Pittenauer E, Rizzi A, Allmaier G.: Characterization of moenomycin antibiotic complex by multistage MALDI-IT/RTOF-MS and ESI-IT-MS. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 17, 1081–1090 (2006).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) 一般財団法人生物科学安全研究所：令和 5 年度生産資材安全確保対策委託事業 飼料中のフラボフォスフォリポールの分析法の開発 (2024).