

ポストカラム誘導体化法による 飼料中ポリエーテル系抗生物質の分析

安藤 恵美子、寺田 英敏

ユーザーベネフィット

- ◆ 「飼料分析基準」に準拠したポリエーテル系抗生物質3成分を広い濃度範囲にわたって安定した定量分析が可能です。
- ◆ 「飼料分析基準」に記載されている微生物学的定量法に比べて、簡単な操作で迅速な分析が可能です。
- ◆ 装置の起動から停止まで自動化することができ、分析の大幅な省力化、効率化が図れます。

■はじめに

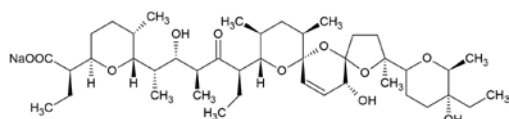
ポリエーテル系抗生物質は、農林省告示第750号¹⁾に基づき飼料添加物として指定されています。これら成分の分析法については、農林水産省消費・安全局長通知の「飼料分析基準」²⁾に微生物学的定量法、HPLC法とLC/MS法が記載されています。微生物学的定量法は試験菌を16~24時間培養するなど長時間の前処理が必要ですが、HPLC法は平均20分の前処理操作で迅速に結果を出すことができます。

本稿では、HPLC法の中でもポストカラム誘導体化可視検出法が指定されている、サリノマイシンナトリウム(SL)、モノニンナトリウム(MN)とナラシン(NR)の分析例をご紹介します。また、蛍光検出法が指定されているラサロシドナトリウムの分析例については01-00128-JPでご報告いたします。

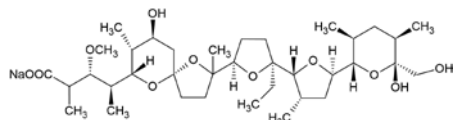
■検出法の原理

今回対象とした3成分の構造式を図1に示します。各成分を逆相クロマトグラフィーで分離後、硫酸-メタノール中で図2に示すバニリン (4-ヒドロキシ-3-メトキシベンズアルデヒド) と加熱反応 (Komarowsky反応) させることで、520 nm付近に極大吸収をもつ誘導体を生成して検出します。

Salinomycin (sodium salt)



Monensin (sodium salt)



Narasin

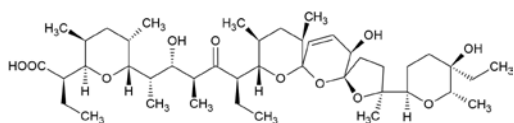


図1 ポリエーテル抗生物質3成分の構造式

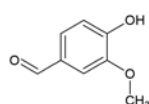


図2 バニリンの構造式

■ 分析装置および分析条件

システム流路を図3に、分析条件を表1に示します。反応液には硫酸が含まれるため、イナートタイプの送液ポンプを使用して送液しています。化学反応槽では、空気循環方式を利用した均一な温度制御により、反応コイルにおいて安定した誘導体化反応を起こすことができるため、再現性の高い分析が可能です。また、本システムを用いることで、装置の起動から停止まで自動化することができます。

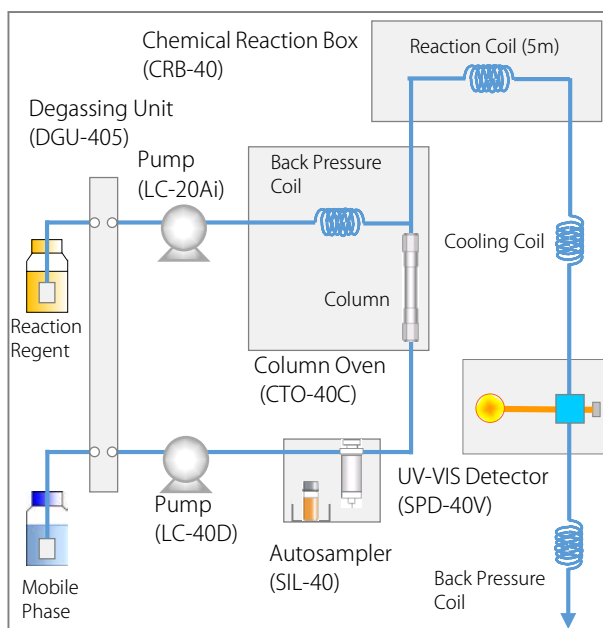


図3 流路図

表1 分析条件

<Separation>	
System	: Nexera lite
Column	: Shim-pack Scepter™ C18-120 (150 mm×4.6 mm I.D., 5 μm) ^{*1}
Mobile Phase	: Water / Methanol / Acetic acid = 60 : 940 : 1 (v : v : v)
Flow Rate	: 0.6 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Vial	: SHIMADZU LabTotal™ for LC 1.5 mL, Glass ^{*2}
<Post-column reaction>	
Reaction Reagent	: Methanol / Sulfuric acid / Vanillin = 95 : 2 : 3 (v : v : w)
Flow Rate	: 0.6 mL/min
Reaction Temp.	: 95 °C
Reaction Coil	: 5 m x 0.5 mm I.D.
Detection	: SPD-40V (Inert-cell ^{*3}) at 520 nm (Lamp: W)

*1 P/N: 227-31020-05 *2 P/N: 227-34001-01
*3 P/N: 228-64728-42

■ 検量線の直線性と面積再現性

「飼料分析基準」記載の飼料を対象とした標準液の最低濃度は0.5 µg(力価)/mLと規定されています。図4,6,8に、規定の半分の濃度にあたる0.25 µg(力価)/mLを20 µL注入した際のクロマトグラムを示します。図5,7,9に「飼料分析基準」記載の濃度を含む範囲で作成した各成分の検量線を示します。赤点は「飼料分析基準」記載の飼料を対象とした前処理に基づき各成分の規格基準値(3)を換算した値を示しています。いずれの成分も寄与率(r^2)は0.999以上と良好な直線性が得られました。表2,3,4に同一バイアルから6回連続で分析した際の各成分の保持時間及びピーク面積の平均値と再現性(%RSD)を示します。低濃度でも良好な再現性が得られ、システムパフォーマンスが安定していることが分かります。

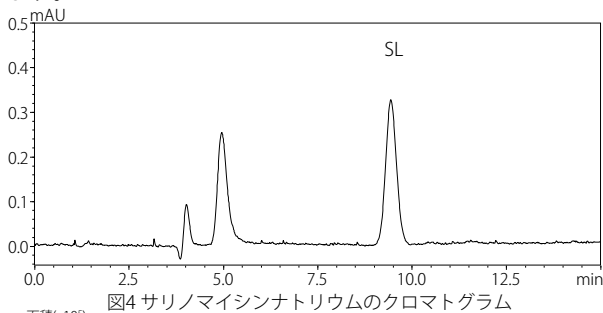


図4 サリノマイシンナトリウムのクロマトグラム

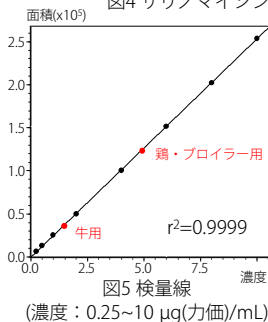


図5 検量線
(濃度：0.25~10 µg(力価)/mL)

表2 再現性
(0.25 µg(力価)/mL, n=6)

	Average	%RSD
保持時間	9.44	0.04
面積	6448	1.00

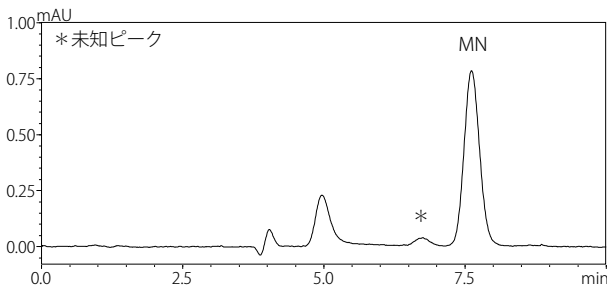


図6 モネンシンナトリウムのクロマトグラム

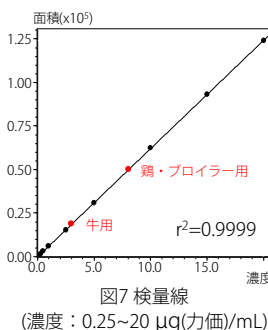


図7 検量線
(濃度：0.25~20 µg(力価)/mL)

表3 再現性
(0.25 µg(力価)/mL, n=6)

	Average	%RSD
保持時間	7.62	0.05
面積	14906	0.47

<参考文献>

- 1) 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 農林省告示第750号)
- 2) 飼料分析基準 (平成20年4月1日・19消安第14729号 農林水産省消費・安全局長通知)
- 3) 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)

Nexera、Shim-pack ScepterおよびSHIMADZU LabTotalは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00127-JP 初版発行：2021年3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

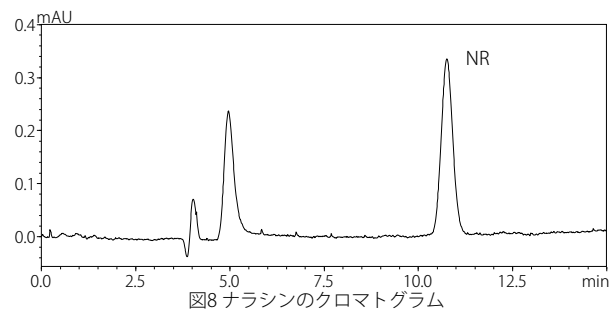


図8 ナラシンのクロマトグラム

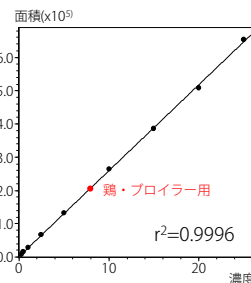


図9 検量線
(濃度：0.25~25 µg(力価)/mL)

表4 再現性
(0.25 µg(力価)/mL, n=6)

	Average	%RSD
保持時間	10.77	0.05
面積	7074	1.02

■ 標準試料の分析

「飼料分析基準」記載の飼料を対象とした手順に基づき作成した鳥用飼料の抽出液に、検量線範囲の最低濃度にあたる0.5 µg(力価)/mLとなるようSL、MN、NRを添加しました。この溶液を20 µL注入した際のクロマトグラムを図10に示します。添加回収試験の結果と、未知ピーク(*), MN、SL、NRの各ピーク間の分離度(各3回の平均)を表5に示します。各ピーク間の分離度は1.5以上となり、添加回収率ともに良好な結果が得られました。

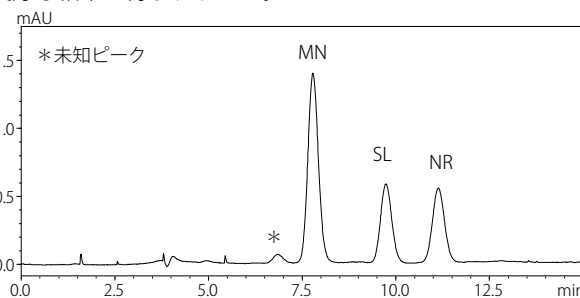


図10 ポリエーテル系抗生物質3成分を添加した鳥用飼料抽出液のクロマトグラム

表5 分離度と添加回収率

	分離度	添加回収率(%)
MN	1.93*	103.3
SL	3.60	100.6
NR	2.45	104.6

*1: MNと未知ピークとの分離度

■ まとめ

本稿では、「飼料分析基準」に準拠したポストカラム誘導体化法によるポリエーテル系抗生物質3成分の分析例をご紹介します。広い濃度範囲にわたって安定した定量結果を迅速に取得することが可能です。さらに、装置の起動から停止までを自動化することで、業務効率の向上に貢献します。

改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>
 閲覧には、会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>