



## 飼料分析法の基礎 ～抗菌性飼料添加物の分析を例に～

### はじめに

安全な畜産物を安定的に供給するためには、安全な飼料を正しく使うことが重要です。

飼料添加物は、飼料の品質低下を防ぎ、有効成分の補給、栄養成分の利用促進のために使用されますが、添加できる飼料が限定される場合があります。抗生物質などの抗菌性飼料添加物は、給餌できる家畜の種類、成育段階や添加量が細かく定められています<sup>1)</sup>。飼料中の含有量を検査する方法は飼料分析基準等に定められています。

今回は、飼料中の抗菌性飼料添加物の分析法を例に、基本的な飼料分析法の試験工程をご紹介します。

### 抗菌性飼料添加物とは

飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律(昭和28年法律第35号、以下「飼料安全法」といいます)の第2条第3項の規定に基づき農林水産大臣が指定する飼料添加物のうち、合成抗菌剤及び抗生物質を「抗菌性飼料添加物」といいます。抗菌性飼料添加物は、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として使用されています<sup>2)</sup>。

現在指定されている合成抗菌剤及び抗生物質は表-1のとおりであり、その他の抗菌性飼料添加物は飼料に含んではならないとされています。

表-1 飼料安全法の規定に基づき、指定されている抗菌性飼料添加物の一覧<sup>3)</sup>

類別	指定されている飼料添加物の種類
合成抗菌剤 (5種)	アンプロリウム・エトパベート, アンプロリウム・エトパベート・スルファキノキサリン, クエン酸モランテル, ナイカルバジン, ハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウム
抗生物質 (11種)	亜鉛バシトラシン, アビラマイシン, エンラマイシン, 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, ノシヘプタイド, ビコザマイシン, フラボフォスフォリポール, モネンシンナトリウム, ラサロシドナトリウム

### 飼料分析基準について

「飼料安全法」の規定に基づいて行う飼料等の検査方法には、「飼料等検査実施要領」に定められています。この要領において、試験は「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律施行規則の規定に基づき検定の方法を定める件」、「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令」、「飼料分析基準」に定めるところによるとされています。この内、「飼料分析基準」は独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC)において、検討・開発された方法が、農林水産省消費・安全局長通知として通知されたものです<sup>4)</sup>。

## 抗菌性飼料添加物の飼料分析法の流れ

飼料分析基準に記載されている、飼料中の合成抗菌物質の分析方法の試験工程を図-1に示しました。測定方法としては、液体クロマトグラフや液体クロマトグラフ質量分析計を用いて測定する機器分析法があります。

抗生物質については、機器分析法に加え、微生物を用いた試験法である平板法やバイオオートグラフ法があります。

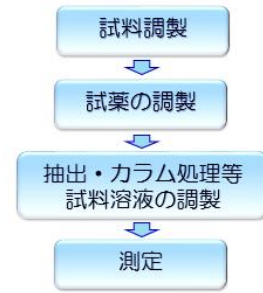


図-1 飼料分析法の試験工程

## 試料調製

乾燥試料の場合、遠心粉碎機(写真-1)を用い、目開き 1 mm または 0.5 mm のスクリーン(写真-2)で粉碎し、よく混合します。また、試料によっては自動乳鉢(写真-3)を用いることもあります。操作は迅速に行い、試料が含有する水分の増減及び試料の化学変化が生じないように留意します。遮光が必要なものについては、アルミ箔等で覆って保管します。



写真-1



写真-2



写真-3

## 試薬等の調製

標準液，緩衝液，希釈溶媒等は，通則や各条の「試薬等の調製」，「定量」，「試料溶液の調製」等の項に記載されている手順に従い調製します。使用前に予備乾燥が必要な標準品は，減圧乾燥器(写真-4)を用いて乾燥させた後，使用します。



写真-4

## 抽出・カラム処理等の試料溶液の調製

試料溶液は各条の「定量」や「試料溶液の調製」の項に記載されている手順で調製します。今回は，クエン酸モランテルの配合飼料(その1)の方法を例にご紹介します。

この方法にはペレットやクランブル等の「加熱試料」と「その他の試料」に対する2つの抽出手順が示されています。いずれも，試料を量り，抽出溶媒を加えた後，30分間かき混ぜて目的物質を抽出しますが，加熱試料は，加温しないとクエン酸モランテルが十分に溶出されず，分析値が低くなることがあるため，40℃に加温しながらかき混ぜます<sup>5)</sup>。加温は，インキュベーター等の暖気による加温よりも，水浴等の温水による加温の方が望ましいとされています。弊財団では写真-5のように，水浴の下にマグネチックスターラーを配置した装置を用いて加温しています。かき混ぜ後は遠心分離を行い，上澄み液をカラムに供する試料溶液とします。カラムの充填剤をガラスのクロマトグラフ管に乾式充てんし，試料溶液をカラムに入れます。この流出液の一部を回収し，遠心分離した上澄み液を測定に用いる試料溶液とします。

クエン酸モランテルは、溶液状態で光に対して極めて不安定であるため、試験には褐色の器具を使用し、開口部はアルミ箔で覆います(写真-6)。



写真-5



写真-6

## 測定

クエン酸モランテルの測定条件例は各条の「定量」の項に記載されています。今回は、液体クロマトグラフ法と抗生物質の測定に用いる平板法について簡単にご紹介します。

### 1) 液体クロマトグラフ法

検量線作成用の標準液と試料溶液を液体クロマトグラフで測定します。得られたクロマトグラムからピーク面積又はピーク高さから標準液の濃度から、図-2のような検量線を作成し、試料溶液中の測定物質の量を算出します。検出したピークがクエン酸モランテルであることは、標準液のクロマトグラムと比較し、ピークの保持時間、形状や半値幅が一致していることで行います(図-3)。

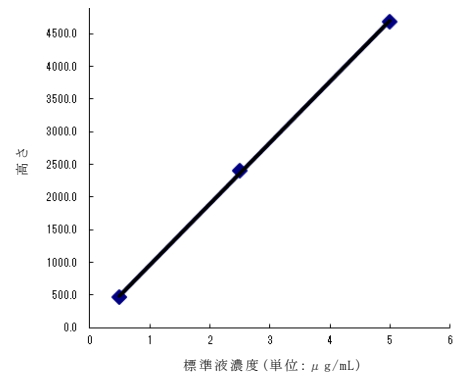


図-2 検量線

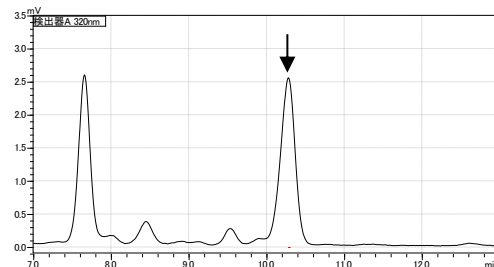
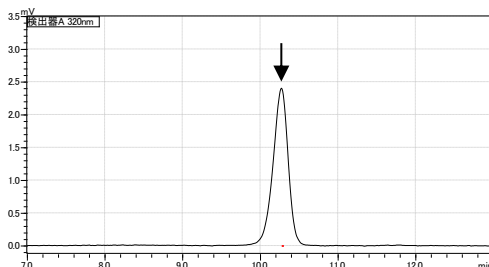


図-3 クエン酸モランテル標準液(左)と試料溶液(右)のクロマトグラム例

### 2) 平板法

平板法とは、寒天培地における抗生物質の拡散性を利用し、抗生物質に感受性を有する試験菌に対して生じた発育阻止円(以下「阻止円」といいます)の直径と抗生物質の濃度の対数との間に、ある濃度範囲内において直線関係が成立することを利用したもので、阻止円の直径を測定することにより、抗生物質の濃度を求める方法です<sup>4)</sup>。平板は寒天平板のことで、試験菌を加えた寒天培地をシャーレに入れて固めたものです。平板法には、標準液や試料溶液を注入するために、寒天平板に滅菌処理をしたステンレス製の円筒を置く「円筒法」と、寒天平板に孔(あな)をあける「せん孔法」があります。円筒法は、カップドロッパー(自動円筒落下装置)(写真-7)で寒天平板の上に均等な距離になるように円筒を4個置きます(写真-8)。一方、せん孔法は、せん孔機(写真-9)で寒天平板に均等な距離になるように孔を4個あけます(写真-10)。せん孔にゆがみがあると、形成する阻止円の形に影響するため、限りなく真円になるようにあける必要があります。



写真-7

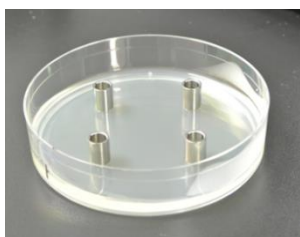


写真-8



写真-9

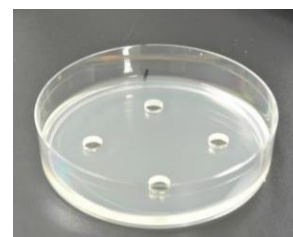


写真-10

各円筒またはせん孔に、一定量の標準液や試料溶液を分注した後、2時間程度寒天平板上に抗生物質を浸透拡散させてから、培養を行います。培養すると、試験菌が生育した場所と阻止円ができます(写真-11)。阻止円の直径をノギス(写真-12)や阻止円測定装置(ゾーンアナライザ)(写真-13)を用いて、0.25 mm 以下まで正確に測定します。測定した阻止円の直径と、標準液の濃度の対数から検量線を作成し、試料溶液から得られる阻止円の直径から、試料濃度を求めます。図-4 は検量線の一例です。

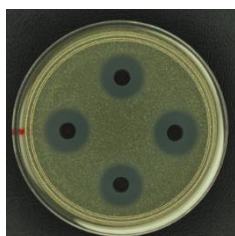


写真-11



写真-12



写真-13

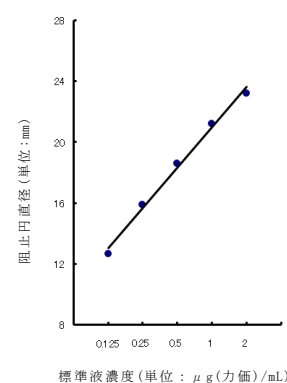


図-4 検量線

## おわりに

抗菌性飼料添加物以外にも飼料の安全性に係る成分や栄養成分の分析を承っておりますので、お気軽にお問合せ下さい。

## 参考文献(参考資料)

- 1) “飼料の適正使用について”。 農林水産省。  
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/siryo/attach/pdf/index-67.pdf>,  
 (参照 2023-04-24)
- 2) “飼料添加物”。 農林水産省。  
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/siryo/additive.html>, (参照 2023-04-24)
- 3) “飼料添加物一覧”。 独立行政法人農林水産消費安全技術センター。  
[http://www.famic.go.jp/ffis/feed/sub3\\_feedadditives.html](http://www.famic.go.jp/ffis/feed/sub3_feedadditives.html), (参照 2023-04-24)
- 4) 社団法人 日本科学飼料協会. 飼料分析法・解説 -2009-. 第1版, 株式会社 芝光社, 2010, 巻頭「飼料分析基準」について. p. 1288
- 5) 野村昌代. 配合飼料中のクエン酸モランテルの液体クロマトグラフによる定量法の改良. 飼料研究報告. 2011. Vol. 36. p. 13-31