

1 愛玩動物用飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発

(1) 総合栄養食（ドライ、セミドライ及びウェット製品）を対象とした分析法の検討

小塚 健志^{*1}, 山本 謙吾^{*2}, 大島 慎司^{*3}

Development of Determination Method of Melamine in Pet Food by LC-MS/MS

(1) Study of Determination Method for Dry, Semi Dry and Wet Food

KOZUKA Kenji^{*1}, YAMAMOTO Kengo^{*2} and OSHIMA Shinji^{*3}

(*1 Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)
(Now Kobe Regional Center, FAMIC),

*2 Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Agricultural Chemicals Inspection Department,
FAMIC),

*3 Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have studied a quantitative determination method of the melamine concentration in pet food (dry, semi dry and wet food) using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Having added acetonitrile-water (1:1) and melamine internal standard solution to a sample, melamine was extracted by homogenizing, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then diluted with acetonitrile-water (1:1). The diluted solution was purified with a solid phase extraction column (Oasis MCX, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of melamine. LC separation was then carried out on a hydrophilic interaction chromatography column (SeQuant ZIC-HILIC, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Merck Millipore Inc.; Burlington, MA, USA) with a gradient of acetonitrile and 10 mmol/L ammonium acetate solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on five kinds of pet foods. Dry food for dogs were added with 0.5 mg/kg of melamine. Dry food for cats was added with 2.5 mg/kg of melamine. Semi dry food for dogs was added with 1 mg/kg of melamine. Wet food for cats was added with 0.5 mg/kg of melamine. Wet food for dogs was added with 0.25 mg/kg of melamine. The resulting mean recoveries ranged from 90.2 % to 106 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 0.6 %.

A collaborative study was conducted by 10 laboratories using dry food for cats, semi dry food for dogs and wet food for dogs, all of which were added with melamine according to the following specifications: 2.5 mg/kg for dry food for cats, 1 mg/kg for semi dry food for dogs, 0.25 mg/kg for wet food for dogs. The resulting mean recoveries ranged from 93.8 % to 107 %. The repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were less than 3.5 % and less than 12 %, respectively. The HorRat ranged from 0.44 to 0.85.

*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, 現 神戸センター

*2 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 農薬検査部

*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

This method was thus validated as useful for inspections of melamine in pet food (dry, semi dry and wet food).

Key words: melamine; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); pet food; collaborative study

キーワード：メラミン；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；愛玩動物用飼料；共同試験

1 緒 言

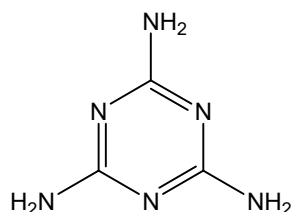
メラミンは、メラミン樹脂（メラミンとホルムアルデヒドとの重縮合により製造された合成樹脂）の原料として使用されている。その他、ラミネート等の幅広い工業用途に用いられている。また、殺虫剤であるシロマジンの代謝物でもある。

2007年に米国において、中国産原料に起因してメラミン及びシアヌル酸に汚染されたペットフードを摂取したイヌとネコにおける腎不全症例が大規模に発生し、2008年には中国において、メラミンが不正に混入された乳幼児用調製粉乳が原因と思われる乳幼児等の腎結石等の被害が報告されている¹⁾。また、中国産の卵・卵製品においても、飼料からの間接的なメラミンの残留が確認されている¹⁾。

日本における愛玩動物用飼料中のメラミンについては、愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令²⁾で基準値が 2.5 mg/kg と設定されており、その分析法は、一般財団法人化学物質評価研究機構が開発した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による方法³⁾（以下「CERI 法」という。）に器具の洗浄操作等の規定を追加したうえで、愛玩動物用飼料等の検査法（以下「検査法」という。）⁴⁾に収載されている。

そこで、CERI 法を検査法へ収載するにあたり実施した、愛玩動物用飼料の総合栄養食（ドライ、セミドライ及びウェット製品）を対象とした、添加回収試験等の追試及び共同試験の結果をとりまとめたので報告する。

参考にメラミンの構造式等を Fig. 1 に示した。



1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine

C₃H₆N₆ MW: 126.12 CAS No.: 108-78-1

Fig. 1 Chemical structure of melamine

2 実験方法

2.1 CERi 法の追試

2.1.1 試料

愛玩動物用飼料のドライ製品（犬用），ドライ製品（猫用）及びセミドライ製品（犬用）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，分析用試料とした．また，ウェット製品（犬用）及びウェット製品（猫用）をフードプロセッサで粉碎し，分析用試料とした．なお，検討に用いた愛玩動物用飼料を Table 1 に示した．

Table 1 Ingredients list of pet foods used in the present study

Pet food types	Ingredients
Dry food for dogs	Grains (corn, wheat flour, wheat bran, corn gluten feed, corn gluten meal, etc.), beans (defatted soybean), oils and fats (beef oil, chicken oil), meats (pork meal, poultry by-product meal, chicken extract, powdered beef bouillon, etc.), fishes (fish meal, etc.), vegetables (spinach, etc.), minerals (Ca, P, Na, Cl, Zn, Fe, Cu, Co, Mn, I), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, K ₃ , choline, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, biotin), antioxidants (tocopherol mixture, rosemary extract)
Dry food for cats	Chicken, rice, corn gluten, corn, animal fat, soybean, chicken extract, cellulose, yeast, fish oil, minerals (Na, K, Cl, Ca, S, Fe, Cu, Zn, I, Mn, Se), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, β -carotene, niacin, pantothenic acid, folic acid, biotin, choline), amino acids (arginine, taurine, methionine), antioxidants (tocopherol mixture, citric acid, rosemary extract)
Semi dry food for dogs 1	Grains (corn, wheat flour, etc.), sugars (high-fructose corn syrup, sucrose), meats (poultry by-product meal, beef meal, powdered chicken breast tender, etc.), beans (defatted soybean, powdered soybean, etc.), animal fat, fishes (fish meal, dried small fish), brewery yeast, cellulose powder, vegetables (spinach powder, carrot powder, pumpkin powder, etc.), cheese powder, propylene glycol, minerals (Ca, Cl, Cu, I, K, P, Zn), emulsifier, preservative (potassium sorbate), malic acid, food colors (titanium dioxide, acid red, tartrazine, sunset yellow FCF, brilliant blue FCF), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, K, choline, pantothenic acid), antioxidants (tocopherol mixture, herb extract)
Semi dry food for dogs 2	Grains (corn, wheat flour, etc.), meats (poultry by-product meal, beef meal, powdered chicken breast tender, etc.), sugars (high-fructose corn syrup, sucrose, oligosaccharide), beans (defatted soybean, etc.), animal fat, brewery yeast, vegetables (beet pulp, carrot powder, pumpkin powder, spinach powder), herb, fishes (dried small fish), propylene glycol, glycerin, minerals (Ca, Cl, Cu, I, K, P, Zn), emulsifier, preservative (potassium sorbate), acidity regulators (malic acid, citric acid), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, K, choline, pantothenic acid), food colors (titanium dioxide, acid red, tartrazine, sunset yellow FCF, brilliant blue FCF), antioxidants (tocopherol mixture, herb extract)
Wet food for cats	Tuna, whitebait, oligosaccharide, minerals (Ca, P, Fe, Cu, Mn, Zn, I), vitamins (A, D, E, K, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , niacin, pantothenic acid, folic acid, biotin, choline)
Wet food for dogs	Chicken meat, beef meat, rice, oligosaccharide, polysaccharide thickener, minerals, emulsifier, vitamins, color former (sodium nitrite)

2.1.2 試薬

- 1) アセトニトリル（LC-MS/MS の溶離液のみ LC-MS 用）及びメタノールは残留農薬・PCB 試験用，酢酸アンモニウムは LC-MS 用，その他の試薬は試薬特級を用いた．水は Milli-Q Integral 5（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた．
- 2) メラミン標準原液
メラミン標準品（和光純薬工業製，純度 99.0 %）10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリル-水（1+1）を加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてメラ

ミン標準原液を調製した（この液 1 mL は、メラミンとして 100 μg を含有）。

3) メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 内標準液

メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 標準原液（Cambridge Isotope Laboratories Inc.製，純度 $^{13}\text{C}_3$ 99 %， $^{15}\text{N}_3$ 98 %，100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ，標線までアセトニトリル-水（1+1）を加えてメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 内標準液を調製した（この液 1 mL は，メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ として 1 μg を含有）。

4) 検量線作成用標準液

使用に際して，メラミン標準原液及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 内標準液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し，1 mL 中にメラミンとして 0.5，1，2，5，10，50，100 及び 200 ng を含有し，かつメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ として 5 ng を含有する検量線作成用標準液を調製した。

5) ケイソウ土

ハイフロスーパーセル（和光純薬工業製）を用いた。

抽出液の吸引ろ過に当たり，ブフナー漏斗上に積層したときに約 5 mm の厚さになる量のケイソウ土をビーカーにとり，液面がケイソウ土の容積の 2 倍量程度に達するまでアセトニトリル-水（1+1）をビーカーに加えて懸濁させた。流出液を受ける容器をブフナー漏斗の下に置き，懸濁液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後，先のビーカー及びろ紙上のケイソウ土を順次少量のアセトニトリル-水（1+1）で洗浄し，同様に吸引ろ過した。このビーカー及びケイソウ土の洗浄操作を更に数回繰り返した。

6) 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムメタノール溶液

水酸化ナトリウム 8 g を水 100 mL に溶かし，更にこの液 5 mL にメタノール 95 mL を加えて調製した。

7) 0.1 mol/L 塩酸メタノール溶液

塩酸 8.5 mL に水を加えて 50 mL とし，更にこの液 5 mL にメタノール 95 mL を加えて調製した。

2.1.3 装置及び器具

1) 粉砕機：ZM 200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）

2) ホモジナイザー：Polytron PT-K Kinematica 製

3) 強酸性陽イオン交換体ミニカラム（以下「ミニカラム」という。）：Oasis MCX（充てん剤量 500 mg）Waters 製

4) メンブランフィルター：HLC-DISK 13 溶媒系（孔径 0.2 μm ，直径 13 mm，PTFE）関東化学製

5) LC-MS/MS：

LC 部：ACQUITY UPLC Waters 製

MS/MS 部：Xevo TQD Waters 製

2.1.4 定量方法

ガラス器具は，器具に由来するメラミンの影響を防ぐため，あらかじめ超音波洗浄した後，水道水，超純水，アセトニトリルで順次洗浄したものをを用いた。

1) 抽出

分析試料 1 g を正確に量って 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ，アセトニトリル-水（1+1）

20 mL を加えた。さらに、この共栓遠心沈殿管にメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 内標準液 0.5 mL を正確に加えた後、ホモジナイザーで 1 分間かき混ぜて抽出した。50 mL の首太全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をあらかじめケイソウ土をのせたろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した。ケイソウ土上の残さを先の共栓遠心沈殿管に戻し、アセトニトリル-水 (1+1) 10 mL を加え、ホモジナイザーで 1 分間かき混ぜて抽出した。抽出液を同様に吸引ろ過して、先の首太全量フラスコに加えた後、首太全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (1+1) を加え、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

ミニカラムを 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムメタノール溶液 5 mL, 0.1 mol/L 塩酸メタノール溶液 5 mL, アセトニトリル 5 mL 及びギ酸 (1+24) 5 mL で順次洗浄した。試料溶液 2 mL をあらかじめギ酸 (1+24) 3 mL を入れたミニカラムに加えて混和し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。さらに、アセトニトリル 5 mL 及びアセトニトリル-ジエチルアミン (499+1) 5 mL を順次ミニカラムに加えて洗浄した後、圧注して全量を流出させた。100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-ジエチルアミン (49+1) 15 mL をミニカラムに加えてメラミンを溶出させた後、圧注して全量を溶出させた。溶出液を 40 °C 以下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した。アセトニトリル 4 mL を正確に加え、5 分間超音波処理して残留物を溶かした後、メンブランフィルター (孔径 0.2 μm 以下) でろ過し、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各検量線作成用標準液各 2 μL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (以下「SRM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	SeQuant ZIC-HILIC (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 5 μm), Merck Millipore
Mobile phase	Acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate solution (17:3) (hold for 7 min) → 8 min → (2:3) (hold for 20 min) → 8 min → (17:3) (hold for 7 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Ion source temperature	150 °C
Desolvation temperature	400 °C
Capillary voltage	0.6 kV

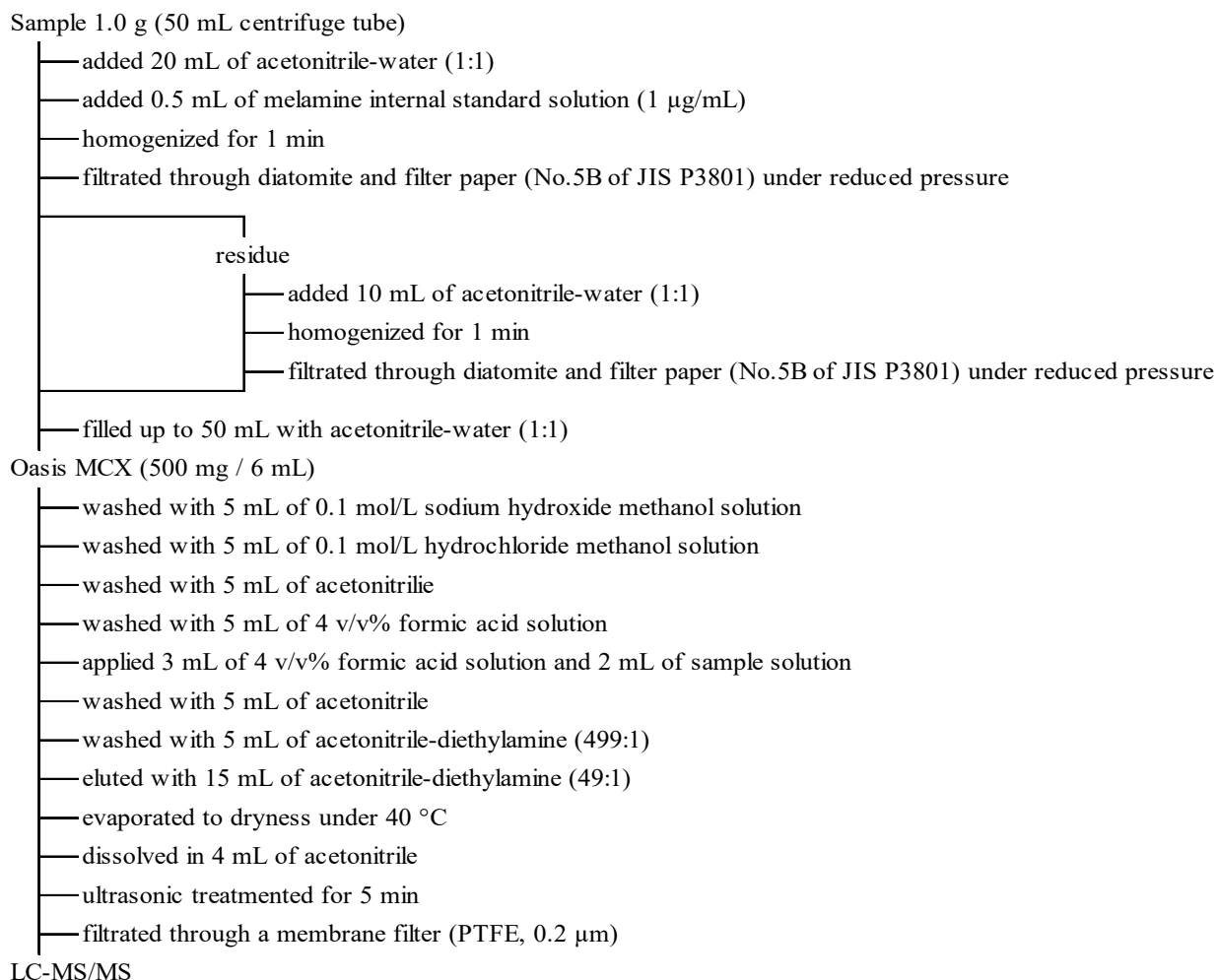
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (m/z)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier (m/z)	Qualifier (m/z)		
Melamine	127	85	-	46	16
		-	68	46	22
Melamine- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$	133	89	-	50	18

4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからメラミン及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のメラミン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for melamine in pet food

2.2 共同試験

2.2.1 試 料

2.1.1 で粉砕したドライ製品（猫用），セミドライ製品（犬用）2及びウェット製品（犬用）を用いた。これらについて、約 1.5 g ずつ小分けしたもの（試料名は非表示）各 2 袋を試験用試料として計 6 袋を各試験室に配付した。

2.2.2 試 薬

1) 各試験室で準備した試薬

アセトニトリル及びメタノールは市販の液体クロマトグラフ用又はこれと同等以上のもの、その他の試薬は試薬特級又はこれと同等以上のものを用いた。ケイソウ土はハイフロスーパーセル（和光純薬工業製）と同等なものを用いた。水は LC-MS/MS の溶離液として使用可能な精製水（例えば、JIS K0557 に定義された A3 又は A4 の水）を用いた。

2) 配付試薬

検量線作成用標準原液（メラミン 10 $\mu\text{g/mL}$ 含有），内標準原液（メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 1 $\mu\text{g/mL}$ 含有），ドライ製品添加用標準液（メラミン 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 含有），セミドライ製品添加用標準液（メラミン 1 $\mu\text{g/mL}$ 含有）及びウェット製品添加用標準液（メラミン 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 含有）を各 1 本，濃度は非通知で 2.2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。

2.2.3 分析試料

2.2.1 の試験用試料を非明示の 2 点反復で用いた。分析試料としては，メラミンとしてドライ製品に 2.5 mg/kg 相当量（試験用試料 1.0 g に対してドライ製品添加用標準液 1 mL を正確に添加）を，セミドライ製品に 1 mg/kg 相当量（試験用試料 1.0 g に対してセミドライ製品添加用標準液 1 mL を正確に添加）を，ウェット製品に 0.25 mg/kg 相当量（試験用試料 1.0 g に対してウェット製品添加用標準液 1 mL を正確に添加）を，分析開始の前日（ウェット製品のみ分析開始 30 分前）に添加して調製した。

2.2.4 定量方法

2.1.4 によった。

2.2.5 報告方法

分析値は，分析試料中濃度（mg/kg）で表し，4 桁目を四捨五入して有効桁数 3 桁まで報告を求めた。

2.2.6 分析実施期間

平成 25 年 2 月 18 日から平成 25 年 3 月 26 日まで

2.2.7 解析方法

結果の解析は，国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{5), 6)}を参考に，Cochran 検定，single Grubbs 検定及び paired Grubbs 検定を行い，外れ値の有無を確認した上で平均回収率，繰返し精度（ RSD_r ）及び室間再現精度（ RSD_R ）を算出し，得られた RSD_R から，修正 Horwitz 式⁷⁾を用いて HorRat を求めた。

2.2.8 参加試験室

協同飼料株式会社研究所，一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所，財団法人マイコトキシシン検査協会，財団法人日本食品分析センター彩都研究所，一般財団法人新日本検定協会，社団法人日本科学飼料検査協会科学飼料研究センター，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，同仙台センター，同名古屋センター，同神戸センター（計 10 試験室）

3 結果及び考察

3.1 CERI 法の追試

3.1.1 検量線の作成

1 mL 中にメラミンとして 0.5, 25, 50, 100, 125, 150, 175 及び 200 ng を含有し，かつメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ として 5 ng を含有する標準液 2 μL を LC-MS/MS に注入し，得られた SRM クロマトグラムからメラミン及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ のピーク面積比を求めて検量線を作成した。その結果，検量線は Fig. 2 のとおりとなり，メラミン及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ のピーク面積比 0.1~40（メラミンとして 0.5~200 ng/mL（注入量として 1~400 pg））の範囲で直線性を示した。

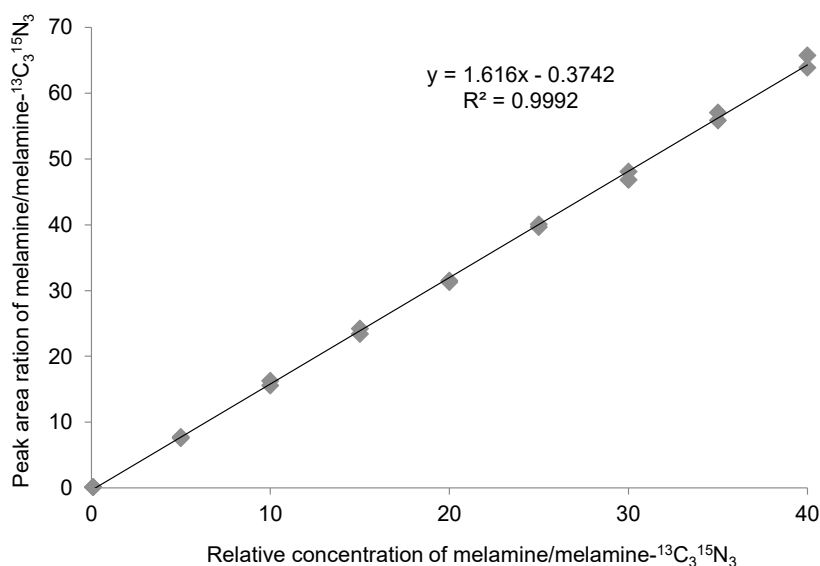


Fig. 2 Internal standard calibration curves of melamine by peak area

3.1.2 試薬，器具等に由来するメラミンの除去方法の検討

2.1.1 で調製した試料を用い，CERI 法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入したところ，いずれの試料からもメラミンのピークが検出されたことから，試薬，器具等からメラミンのピークが検出されるかどうかを確認した．試料を用いずに CERI 法の一連の操作手順により調製した空試験溶液を LC-MS/MS で測定した結果，試薬等からもメラミンが検出されることが判明した．

そこで，確認された試薬等に由来するメラミンを除去するための方法として，器具の洗浄等を検討した．具体的には次の 1)~3)に留意した上で，CERI 法により分析したところ，空試験溶液におけるメラミン量の低減が認められた．

- 1) ガラス製の器具を使用する．使用にあたっては，あらかじめ超音波洗浄した後，水道水，超純水，アセトニトリルで順次洗浄したものを使用する．
- 2) ミニカラムにリザーバーを連結して使用する場合，リザーバーはガラス製のシリンジを用いる．
- 3) ケイソウ土はアセトニトリル-水 (1+1) に懸濁させ，吸引しながらろ紙上に約 5 mm の厚さになる量を流し込み，更にアセトニトリル-水 (1+1) を加えて洗浄する．

3.1.3 添加回収試験

3.1.2 の器具の洗浄等に留意した上で，共同試験に先立ち予備検討として CERI 法に従って添加回収試験を実施した．分析試料は，ドライ製品 (犬用) に 0.5 mg/kg 相当量，ドライ製品 (猫用) に 2.5 mg/kg 相当量，セミドライ製品 (犬用) 2 に 1 mg/kg 相当量，ウェット製品 (猫用) に 0.5 mg/kg，ウェット製品 (犬用) に 0.25 mg/kg 相当量 (ウェット製品はいずれも原物中濃度) のメラミンを添加して調製した．

その結果は Table 4 のとおり，平均回収率は 90.2~106 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 2.9 %以下の成績が得られた．

Table 4 Recoveries for melamine

Spiked level (mg/kg)	Dry food for dogs		Dry food for cats		Semi dry food for dogs 2		Wet food for cats		Wet food for dogs	
	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	106	1.0
0.5	90.2	2.9	-	-	-	-	102	0.6	-	-
1	-	-	-	-	96.5	0.9	-	-	-	-
2.5	-	-	97.3	2.6	-	-	-	-	-	-

-: Not tested

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.2 共同試験

2.2により共同試験を実施した結果は Table 5 のとおりであった。1 試験室において、すべての試料で指示した方法からの逸脱があったため、当該試験室の結果は除外した。平均回収率は 93.8~107%，RSD_rは 2.1~3.5%，RSD_Rは 7.0~12%，HorRat は 0.44~0.85 であり、試験法の妥当性確認法に定められた室間再現精度の目標値（ドライ製品で 28 %以下，セミドライ製品で 32 %以下，ウェット製品で 39 %）を満たしていた。

なお、参考として各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 6 に示した。

Table 5 Collaborative study for melamine

Lab. No.	Dry food for cats		Semi dry food for dogs 2		Wet food for dogs	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	2.23	2.26	0.867	0.835	0.264	0.266
2	2.49	2.41	0.953	0.958	0.243	0.247
3	1.74	1.88	0.821	0.874	0.219	0.202
4	2.53	2.58	1.00	1.01	0.269	0.264
5	1.87	2.12	0.944	0.896	0.336	0.312
6	2.53	2.57	0.953	0.945	0.256	0.267
7	2.49	2.47	0.999	0.992	0.276	0.280
8	2.43	2.47	1.04	1.02	0.301	0.289
9	2.63	2.53	0.972	0.995	0.251	0.271
Spiked level (mg/kg)	2.5		1		0.25	
No. of labs ^{a)}	9		9		9	
No. of outliers ^{b)}	0		0		0	
Mean value (mg/kg)	2.35		0.949		0.267	
Mean recovery (%)	93.8		94.9		107	
RSD _r ^{c)} (%)	3.3		2.1		3.5	
RSD _R ^{d)} (%)	12		7.0		12	
PRSD _R ^{e)} (%)	14		16		20	
HorRat	0.85		0.44		0.62	

a) Number of laboratories retained the outliers were removed.

b) Number of the removed outliers

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 6 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d. × length, particle size)
1	LC: Alliance2695, Waters MS/MS: Quattro micro API, Micromass	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm)
2	LC: Alliance2695, Waters MS/MS: Quattro Premier XE, Waters	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
3	LC; Prominence, Shimadzu MS/MS: API4000QTrap, AB Sciex	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC System, Waters MS/MS: Xevo TQD, Waters	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
5	LC: 1200series, Agilent Technologies MS/MS: 6410, Agilent Technologies	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
6	LC: ACQUITY UPLC System, Waters MS/MS: ACQUITY TQ Detector, Waters	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
7	LC; Prominence, Shimadzu MS/MS: TSQ QUANTUM ULTRA, Thermo SCIENTIFIC	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
8	LC; Prominence, Shimadzu MS/MS: API4000, AB Sciex	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
9	LC: ACQUITY UPLC System, Waters MS/MS: ACQUITY TQ Detector, Waters	SeQuant ZIC-HILIC, Merck Millipore (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)

4 まとめ

愛玩動物用飼料の総合栄養食中のメラミンについて、CERI法の検査法への収載の可否を検討したところ、以下の結果が得られ、器具の洗浄等に留意することで、収載が可能であると考えられた。

- 1) 検量線はメラミン及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ のピーク面積比0.1~40（メラミンとして0.5~200 ng/mL（注入量として1~400 pg））の範囲で直線性を示した。
- 2) 器具の洗浄等に留意することにより、空試験溶液におけるメラミン量の低減が認められた。
- 3) メラミンとしてドライ製品（犬用）に0.5 mg/kg相当量、ドライ製品（猫用）に2.5 mg/kg相当量、セミドライ製品（犬用）に1 mg/kg相当量、ウェット製品（猫用）に0.5 mg/kg、ウェット製品（犬用）に0.25 mg/kg相当量（ウェット製品はいずれも原物中濃度）を添加した試料を用いて、器具の洗浄等に留意した上で、CERI法に従って定量したところ、平均回収率は90.2~106%， RSD_r は2.9%以下であった。
- 4) メラミンとしてドライ製品に2.5 mg/kg相当量、セミドライ製品に1 mg/kg相当量を、犬用ウェット製品に0.25 mg/kg相当量を添加した試料を用いて10試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、試験法の妥当性確認法に定められた室間再現精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた協同飼料株式会社研究所、一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所、財団法人マイコトキシン検査協会、財団法人日本食品分析センター彩都研究所、一般財団法人新日本検定協会及び社団法人日本科学飼料検査協会科学飼料研究センターにおける関係者各

位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 食品安全委員会：メラミン等による健康影響について，平成 20 年 10 月 9 日 (2008).
- 2) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 3) 一般財団法人化学物質評価研究機構：平成 23 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業報告書 (2012).
- 4) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について，平成 21 年 9 月 1 日，21 消技第 1764 号 (2009).
- 5) Horwitz W: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995).
- 6) Latimer Jr GW.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 7) Thompson M: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, 125(3), 385-386 (2000)