

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

(2) スナック製品への適用のための妥当性確認

高橋 亜紀子^{*1}, 小塚 健志^{*2}, 大島 慎司^{*3}

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

(2) Validation Study on Application to Snack Type Pet Food

TAKAHASHI Akiko^{*1}, KOZUKA Kenji^{*2} and OSHIMA Shinji^{*3}

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

^{*2} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Kobe Regional Center, FAMIC),

^{*3} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have made a validation study on the applicability of a determination method of melamine in pet food (dry, semi dry and wet food), which has been listed in the inspection method for pet foods of Japan, to snack type pet food.

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 snack type pet foods. Melamine was added at the levels of 0.5 mg/kg and 2.5 mg/kg to samples respectively. The resulting mean recoveries ranged from 84.6 % to 106 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 6.4 %.

This method was thus validated as useful for inspections of melamine in snack type pet food.

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

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；スナック製品

1 緒 言

愛玩動物用飼料等の検査法（以下「検査法」という。）¹⁾に収載する分析法については、流通量

^{*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 企画調整部

^{*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 神戸センター

^{*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

及び摂食量の多い、総合栄養食（ドライ、セミドライ及びウェット製品）を対象に先行して整備を進めたが、平成 25 年に米国 FDA が、中国産ジャーキーに起因すると推測される犬猫への原因不明の健康被害の発生を公表²⁾したことから、我が国でもジャーキー等のスナック製品³⁾（以下「スナック製品」という。）を検査法の対象とするための検討を始めた。

これを受けて、有害物質の一つであるメラミンの分析法についても検討が必要となり、先に検査法に記載された総合栄養食を対象とする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。）による分析法について、スナック製品に適用するための妥当性確認を実施したので、その結果を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

市販の愛玩動物用のスナック製品のうち成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）及び菓子類は、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。なお、有姿のままでは粉碎が困難な試料は、はさみ等を用いて細断したのち粉碎した。粒度が 1 mm 以下であった粉ミルクはそのまま分析用試料として用いた。

なお、検討に用いたスナック製品を Table 1 に示した。

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

Pet food types	Ingredients
Formed jerky for dogs	Meats (chicken breast tender, etc.), starches, vegetables (cabbage, carrot, etc.), oils and fats, dietary fibers (cellulose powder), thickening stabilizer (modified starch, glycerin), preservative (potassium sorbate), flavor, food colors (titanium dioxide, new cocchine, acid red, tartrazine, sunset yellow FCF, brilliant blue FCF), antioxidants (tocopherol mixture, rosemary extract)
Formed jerky for cats	Meats (chicken, beef), soy protein, wheat flour, fish meat, beef oil, silver vine, glycerin, thickening stabilizer (modified starch), sorbitol, minerals (Ca, P, Na), preservative (sorbic acid, sodium dehydroacetate), perilla seasoning, color former (sodium nitrite), deodorant (sodium polyacrylate), food colors (caramel, acid red), vitamin E
Dried jerky for dogs (hard type)	Chicken breast tender, pea protein, glycerin, sorbitol, minerals (Na), acidity regulator
Dried jerky for dogs (soft type) 1	Chicken breast tender, egg white, glucosamine, oligosaccharide, cartilage extract (chondroitin-containing), trehalose, glycerin, acidity regulator, propylene glycol, thickening stabilizer (modified starch, xanthan gum), potassium chloride, antioxidants (sodium erythorbate), preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite), raising agent
Dried jerky for dogs (soft type) 2	Gizzard, salt, sorbitol, propylene glycol, antioxidants (sodium erythorbate, V.E, V.C), preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (soft type) 3	Beef rib, salt, sorbitol, propylene glycol, antioxidants (sodium erythorbate, V.E, V.C), preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite)
Confectionery (biscuit) for dogs	Wheat flour, margarine, granulated sugar, egg, fermented rice germ·soybean extract, galactooligosaccharide, protein concentrated whey powder (dairy products), skim milk, lactose, vegetable oil, sweetner (D-sorbitol), calcium carbonate, green tea extract, antioxidants (V.E, rosemary extract)
Milk powder for dogs	Milk powder (skim milk, casein), oils and fats (vegetable oil, animal fat, γ -linolenic acid), egg yolk powder, soy protein, oligosaccharide, L-carnitine, minerals (Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), emulsifier, vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, K, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, choline), flavor, taurine

2.2 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 µg/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
ハイフラスーパーセル (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.

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機: 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 : 1200 Series Agilent Technologies 製

MS/MS 部 : Agilent 6410 Triple Quad LC/MS Agilent Technologies 製

2.4 定量方法

検査法第 9 章の 1 の B によった。本報告における LC-MS/MS の測定条件を 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. × 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
Nebulizer gas	340 kPa
Drying gas	350 °C
Capillary voltage	4 kV

Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Fragmentor voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
Melamine	127	85	-	100	16
		-	68	100	30
Melamine- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃	133	89	-	100	18

3 結果及び考察

3.1 妨害物質の検討

8 種類のスナック製品各 1 点を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

ただし、本法においては、使用する試薬・器具等に由来するメラミンが検出されることが判明しており、検出限界未満となる小さなものではあるが、いずれの試料の測定においてもメラミンのピークが検出された。これらピークを試料中のメラミン量として算出すると 0.0232 ~ 0.0645 mg/kg であった。

3.2 添加回収試験

5 種類のスナック製品についてそれぞれ 0.5 及び 2.5 mg/kg 相当量のメラミンを添加した試料（最終試料溶液中で各 5 及び 25 ng/mL 相当量）を用いて、本法に従って 5 点併行で定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。その結果は Table 5 のとおり、メラミンの平均回収率は 84.6~106 %、繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 6.4 %以下であり、愛玩動物用飼料等の

検査法第 11 章試験法の妥当性確認法（以下「試験法の妥当性確認法」という。）で定められた真度及び併行精度の目標値（真度：80~110%，精度：0.5 mg/kg 添加では 18%，2.5 mg/kg 添加では 14%）を満たす良好な結果であった。

Table 5 Recoveries for melamine

Pet food types	Spiked level (mg/kg)			
	0.5		2.5	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Formed jerky for cats	99.1	1.4	98.6	1.6
Dried jerky for dogs (hard type)	106	2.1	98.7	0.8
Dried jerky for dogs (soft type) 1	99.5	1.1	98.6	1.3
Confectionery (biscuit) for dogs	98.0	2.2	97.9	0.8
Milk powder for dogs	93.8	1.4	84.6	6.4

a) Mean ($n=5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.3 定量限界（下限）及び検出限界

本法の定量限界（下限）及び検出限界を確認するため、3.2 の添加回収試験により得られたプロダクトイオンのクロマトグラム（Fig. 1）からメラミンのピークにおける SN 比を確認した。その結果、いずれの分析用試料においても、添加回収試験におけるクロマトグラムから得られたピークの SN 比が 10 以上であった添加濃度は 0.5 mg/kg であり、また、同様に SN 比が 3 以上であった添加濃度は 0.2 mg/kg であった。このことから、本法におけるスナック製品の定量限界（下限）及び検出限界は、従来のドライ及びセミドライ製品と同様、それぞれ 0.5 mg/kg 及び 0.2 mg/kg であった。

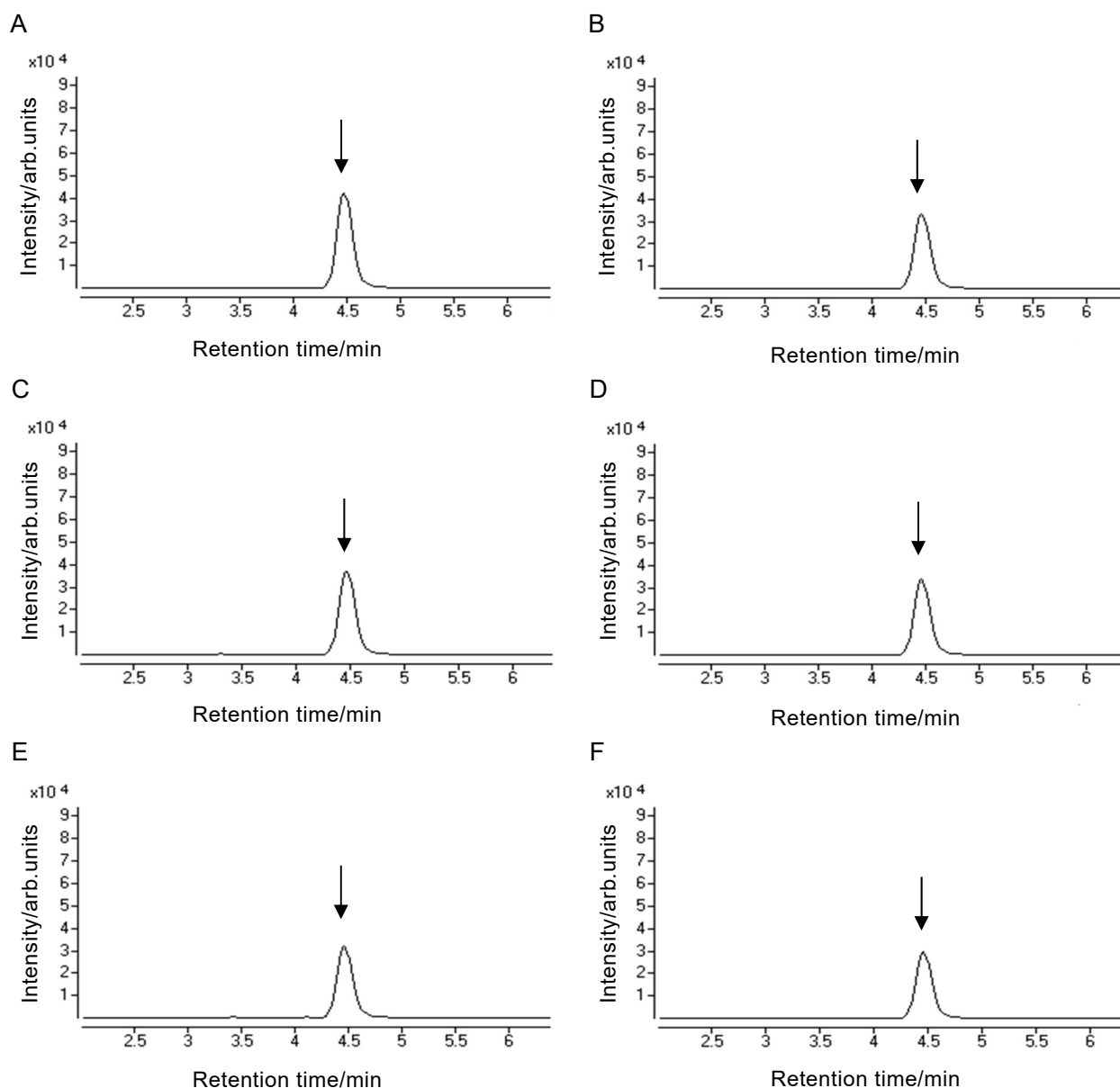


Fig. 1 Typical selected reaction monitoring chromatograms of melamine in standard and spiked sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrow indicates the retention time of melamine.)

A: Standard solution (5 ng/mL)

B: Sample solution of formed jerky for cats (spiked at 0.5 mg/kg of melamine)

C: Sample solution of dried jerky for dogs (hard type) (spiked at 0.5 mg/kg of melamine)

D: Sample solution of dried jerky for dogs (soft type) 1 (spiked at 0.5 mg/kg of melamine)

E: Sample solution of confectionery (biscuit) for dogs (spiked at 0.5 mg/kg of melamine)

F: Sample solution of milk powder for dogs (spiked at 0.5 mg/kg of melamine)

4 まとめ

検査法に既記載の総合栄養食を対象としたメラミンの分析法について、スナック製品への適用の可否を検討したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 本法に従って得られたSRMクロマトグラムでは、8種類のスナック製品において定量を妨げるピークは認められなかった。なお、いずれのスナック製品においても検出限界未満のメラミンのピークが検出された。
- 2) 5種類のスナック製品についてそれぞれ0.5及び2.5 mg/kg相当量のメラミンを添加した試料を用いて、本法に従って5点併行で定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めたところ、試験法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 3) 本法におけるスナック製品の定量限界（下限）及び検出限界は、従来のドライ及びセミドライ製品と同様、それぞれ0.5及び0.2 mg/kgであった。

文 献

- 1) 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)。
- 2) U.S. Food and Drug Administration: FDA Releases Progress on Jerky Pet Treat Investigation, <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm371450.htm>.
- 3) 農林水産省：ペットフードの安全確保に関する研究会第2回配付資料，資料6，http://www.maff.go.jp/j/study/other/pet_food/index.html