

1 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定量法

大島 慎司*

Determination of Melamine in Feeds by LC-MS/MS

Shinji OSHIMA*

(*Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

An analytical method for determination of melamine in feeds using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was developed. After addition of 20 mL of acetonitrile-water (1:1) and Melamine- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$, the sample was homogenized. The extract was centrifuged for 10 min at $1,600 \times g$ and 4 mL of the supernatant was filled up to 10 mL with acetonitrile-water (1:1). The sample solution was purified by strong acidic cation-exchange mini column (Waters, Oasis MCX) with 4 mL of acetonitrile-diethylamine (49:1) and subjected to LC-ESI-MS/MS for determination of melamine. The LC separation was carried out on an hydrophilic interaction chromatography column (MERCK, SeQuant ZIC-HILIC, 2.1 mm i.d. \times 150 mm, 5 μm) using 10 mmol/L ammonium acetate solution-acetonitrile (17:3) as a mobile phase. The determination was performed in a selected reaction monitoring (SRM) mode. A spiked test was conducted with two kinds of formula feed, fish meal, soybean meal and dried skim milk spiked with 0.2 and 1 mg/kg of melamine. The spike test resulted in recoveries ranging from 93.0 % to 117 % of melamine and in relative standard deviations (RSD) within 3.6 % respectively.

Key words: melamine ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer(LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; hydrophilic interaction chromatography ; feed ; fish meal ; soybean meal ; dried skim milk

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；親水性相互作用クロマトグラフィー；飼料；魚粉；大豆油かす；脱脂粉乳

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を主体として縮合させた合成樹脂）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が代謝されてメラミンが生成されることが知られている。

近年、米国において、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、中国においては、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、中国産の卵及び卵製品においても、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⁾。

*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

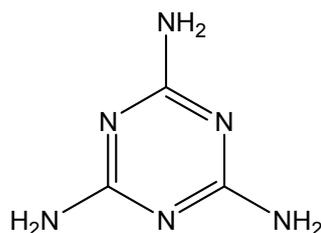
これらの事態を受け、今般、コーデックス委員会汚染物質部会において、食品及び飼料中のメラミンの基準値を 2.5 mg/kg とすることです承され、総会で採択されるに至っている。一方、我が国においても同様に、国内における飼料中の基準値の設定が検討されているところである。

飼料中のメラミンの分析法としては、米国食品医薬品局（FDA）よりガスクロマトグラフ質量分析計による方法²⁾が示されているが、この方法では 10 mg/kg 以下の飼料中のメラミンの含有実態を正確に把握し得ない状況下にある。

また、この他に、低濃度まで定量可能な液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた厚生労働省通知試験法³⁾が示されている。この方法を用いて、平成 21 年度に、国内基準値設定のために各種飼料を対象にしたメラミン汚染実態調査を実施したが、標準液の測定は問題ないものの試料溶液中の内標準の回収率が著しく低く、定量が困難であった。飼料を対象にした場合は、前処理法を改良する必要が認められた。

そこで、FDA が新たに示した、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による方法⁴⁾（以下「FDA 法」という。）の前処理方法を基に検討し、飼料分析基準⁵⁾への適用の可否について検討したので、その概要を報告する。

なお、メラミンの構造式を Fig 1 に示した。



Melamine

C₃H₆N₆ MW: 126.12

CAS No.: 108-78-1

Fig. 1 Chemical structure of melamine

2 実験方法

2.1 試料

市販の配合飼料（鶏用及び豚用配合飼料）、魚粉、大豆油かす及び脱脂粉乳をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕し、供試試料とした。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layer	Grains	61	Corn, Milo, Polished rice
	Oil seed meal	22	Soybean meal, Corn gluten meal, Rapeseed meal
	Brans	3	Corn gluten feed
	Animal by-products	2	Fish meal
	Others	12	Calcium carbonate, Animal fat, Calcium phosphate, Salt, Paprika extract, Enzyme processed copra meal, Silicic acid, Feed additives
For growing pig	Grains	66	Corn, Milo, Polished rice, Barley
	Oil seed meal	16	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn germ meal
	Brans	5	Corn gluten feed, Rice bran
	Animal by-products	2	Fish meal, Meat and bone meal (derived from pork and poultry)
	Others	11	Dried leftover, Animal fat, Molasses, Calcium carbonate, Salt, Vegetable oil, Feed yeast, Bakery waste, Feed additives

2.2 試薬等

1) メラミン標準原液

メラミン標準品（和光純薬工業製，純度 98.0 %）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 ($f=0.980$) を含有する.）.

2) 安定同位体元素標識メラミン（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. 製水溶液，ラベル化率 $^{13}\text{C}_3$ 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，アセトニトリル-水（1+1）を標線まで加えて，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 を含有する.）.

3) 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-ジエチルアミン（49+1）で正確に希釈し，1 mL 中にメラミンとして 1, 5, 10, 50, 100, 150 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 を含有する各検量線作成用標準液を調製した.

4) アセトニトリルは液体クロマトグラフ用試薬を用いた. 特記した以外の試薬については特級を用いた.

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計：

LC 部：Agilent Technologies 製 1200 Series

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

2) 超音波処理装置：SHARP 製 UT-204（最大出力 200 w，39 kHz）

3) ホモジナイザー：Hsiangtai 製 HG-200（使用時回転数 10,000 rpm）

4) 遠心分離器：KOKUSAN 製 H-36

5) 強酸性陽イオン交換体ミニカラム：Waters 製 Oasis MCX（充てん剤量 150 mg）

6) 吸引マニホールド：GL Sciences 製

7) ボルテックスミキサー：ヤマト科学製 MT-31

8) メンブランフィルター: 関東化学製 HLC-DISK 13 溶媒系 (孔径 0.45 μm , 直径 13 mm, PTFE)

2.4 定量方法

1) 抽出

i 脱脂粉乳 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, 水 10 mL を加えた後, 15 分間超音波処理した. この遠心沈殿管にアセトニトリル 10 mL を加え, 更にメラミン- $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$ 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.

抽出液を 1,600 \times g (3,000 rpm) で 10 分間遠心分離し, 上澄み液 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れた. 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.

ii その他の飼料 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. 更にこの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.

抽出液を 1,600 \times g (3,000 rpm) で 10 分間遠心分離し, 上澄み液 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れた. 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

強酸性陽イオン交換体ミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及びぎ酸 (1+24) 5 mL で洗浄した.

試料溶液 2 mL をあらかじめぎ酸 (1+24) 3 mL を入れたミニカラムに加え, 添加した試料溶液を混和し, 液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. 更にアセトニトリル 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.

10 mL の共栓試験管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) 4 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混合した.

溶出液をメンブランフィルター (孔径 0.45 μm 以下) でろ過し, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とした.

3) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各検量線作成用標準液各 5 μL を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.) に注入し, Table 2 及び Table 3 の測定条件に従って選択反応検出クロマトグラムを得た.

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS for analyzing melamine

Column	MERCK, SeQuant ZIC-HILIC (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm)
Mobile phase	acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate solution (17:3)(7 min)→8 min→(2:3) (20 min)→8 min→(17:3)(7 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N ₂ (340 kPa)
Drying gas temperature	N ₂ (350 °C)
Capillary voltage	4 kV

Table 3 MS/MS Parameters

Substance	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	Fragmentor (V)	Collision (eV)
Melamine	127	68	85	100	33
Melamine- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃	133	89		100	18

4) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムからメラミン及びメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ 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。

Sample 1 g

- add 20 mL of acetonitrile-water (1:1) (Dried skim milk ; add 10 mL of water, and add 10 mL of acetonitrile after ultrasonic treatment for 15 min)
- add 0.5 mL of internal standard solution
- homogenize for 1 min at 10,000 rpm
- centrifuge for 10 min at 1,600×g
- 4 mL of supernatant fill up to 10 mL with acetonitrile-water (1:1)

Oasis MCX

- prewash with 5 mL acetonitrile and formic acid (1:24)
- transfer 2 mL of sample solution into 3 mL of formic acid (1:24) and apply
- wash with 5 mL acetonitrile and acetonitrile-diethylamine (499:1)
- elute with 4 mL acetonitrile-diethylamine (49:1)
- filter with a membrane filter (0.45 μm)

LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for melamine in feeds

3 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS 測定条件

厚生労働省通知試験法³⁾の測定条件を基にして、Table 2 及び Table 3 のとおり測定条件を決定した。ただし内標準については、メラミン-¹³C₃¹⁵N₃の定量イオンについて記載されている FDA 法⁴⁾の条件を採用した。

また、液体クロマトグラフの溶離液条件については、連続して測定した際、試料溶液中のジェチルアミンがカラムに残存することにより、感度が低下する傾向が認められたため、測定対象物質の溶出後にグラジェント溶出でカラムを洗浄することとした。

3.2 絶対検量線法と内標準法の検討

厚生労働省通知試験法³⁾及び FDA 法⁴⁾では内標準法による定量を採用している。そこで、本法における内標準法の必要性について検討した。

2.1 で調製した肉豚肥育用配合飼料、魚粉及び脱脂粉乳にメラミンとして 2.5 mg/kg 相当量添加した試料を用いて、本法に従って 3 点併行分析を実施し、絶対検量線法及び内標準法におけるそれぞれのメラミンの回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は、Table 4 のとおり、絶対検量線法では平均回収率 43.6~79.0%，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 11%以下であった。内標準法では平均回収率 95.6~99.5%，その繰返し精度は、RSD として 3.1%以下であった。

魚粉及び脱脂粉乳において絶対検量線法では回収率が低く定量が困難であった。また、いずれの試料においても絶対検量線法と比較して内標準法による定量結果の方が良好な結果となったことから、本法においても内標準法による定量を採用することとした。

Table 4 Recoveries for melamine by absolute calibration method and internal standard method

Spiked level (mg/kg)	Kind of sample	Absolute calibration method		Internal standard method	
		Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
		(%)	(%)	(%)	(%)
2.5	Formula feed for growing pig	79.0	4.3	95.6	3.1
	Fish meal	43.6	1.3	99.5	1.4
	Dried skim milk	58.9	11	98.7	2.9

a) Mean(n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.3 検量線の作成

2.2 の 3)に従って調製した検量線作成用標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムからメラミン及びメラミン-¹³C₃¹⁵N₃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、メラミンとして 1~200 ng/mL (注入量として 5~1000 pg) の範囲で直線性を示した。

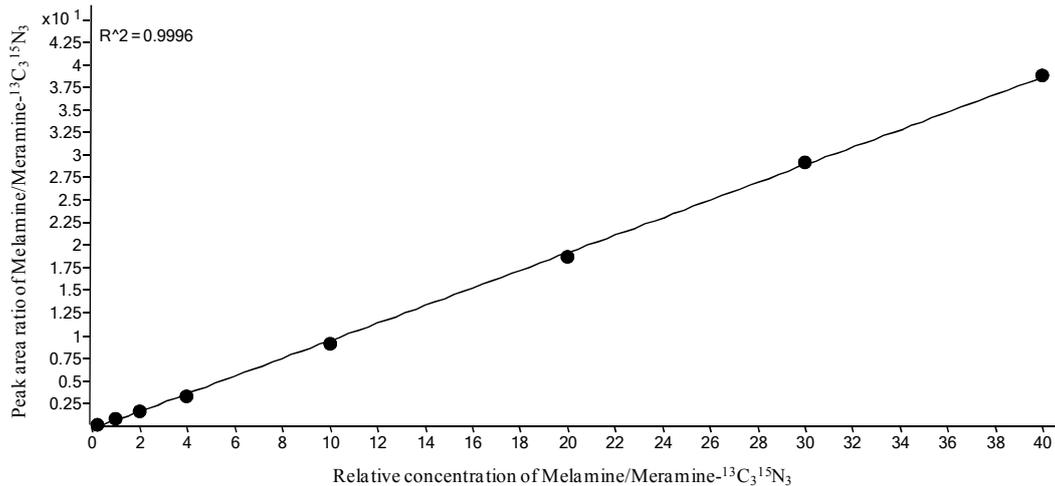


Fig. 2 Calibration curve of melamine by area

3.4 試料採取量の検討

1) 試料と抽出溶媒の比率の検討

FDA 法⁴⁾では試料 5 g にアセトニトリル-水 (1+1) 20 mL で抽出することとしている。始めに、魚粉にメラミンとして 1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて FDA 法⁴⁾への適用を確認したところ、内標準法によるメラミンの回収率は良好であったが、内標準であるメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ の回収率が 40 %を下回る結果であった。

内標準の回収率が良好でない原因は夾雑成分を原因とするイオン化抑制であると推定し、イオン化抑制を軽減するためにメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ の回収率を指標として、魚粉にメラミンとして 1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて次の検討を行った。

試料と抽出溶媒の比率が 1:20, 1:10 及び 1:4 となるように、試料の採取量を 1, 2 及び 5 g と変え、アセトニトリル-水 (1+1) 20 mL 及びメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ 内標準液 200 µL を正確に加えそれぞれ抽出した。抽出液を 1,600×g (3,000 rpm) で 10 分間遠心分離した後、上澄み液 2 mL を 2.4 の 2) のカラム処理に供する試料溶液とし、以下本法に従って分析を実施した。

その結果は、Table 5 のとおりであり、試料採取量を 1 g にすることによりメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ の回収率が 40 %以上となった。このことから、以降の検討では試料 1 g に対して 20 mL の比率になるように抽出溶媒を用いることとした。

Table 5 Recoveries of Melamine-¹³C₃¹⁵N₃ by each ratio of sample weight and extracting solvent

Kind of sample	Sample weight (g)	Sample : Solvent (g : mL)	Melamine- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃
			Recovery ^{a)} (%)
Fish meal	1	1 : 20	48.3
	2	1 : 10	33.7
	5	1 : 4	19.6

a) Mean(n=1)

2) 試料採取量の妥当性確認

飼料分析基準では、通常有害物質の定量に際して、その対象成分の試料中での偏在を考慮し

て、5 g 以上を採取していることが多いことから、先に決めた試料採取量 1 g が採取量として妥当であるか確認するため、メラミンで汚染が確認されている魚粉及び下記 i により調製した試料を用いて次の検討を行った。

i : 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎した市販の成鶏飼育用配合飼料 100 g にメラミンとして 2.5 mg/kg 相当量となるようにメラミン標準液を添加した後、溶媒が十分に揮発するまで静置した。その後 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎して再度均一化を行い、供試試料とした。

試料 1 g に対して 20 mL の抽出溶媒、試料 2 g に対して 40 mL の抽出溶媒及び試料 4 g に対して 80 mL の抽出溶媒を加え、3.4 の 1) と同様にカラム処理に供する試料溶液を調製し、以下本法に従って 3 点併行分析を実施し、メラミンの定量値及び繰返し精度を求めた。

結果を Table 6 に示した。定量値及び繰返し精度に差は認められず、試料採取量 1 g でも問題なかったことから試料採取量を 1 g、抽出溶媒を 20 mL とした。

Table 6 Quantitative value of melamine by each sample weight

Kind of sample	Sample weight (g)	Extracting solvent (mL)	Melamine ^{a)} (mg/kg)	RSD ^{b)} (%)
Fish meal	1	20	4.5	3.2
	2	40	4.6	5.5
	4	80	4.4	2.5
Formula feed for layer	1	20	2.5	0.7
	2	40	2.4	0.7
	4	80	2.4	0.3

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.5 脱脂粉乳への適用の検討

1) 抽出方法の検討

脱脂粉乳にアセトニトリル-水 (1+1) を加え抽出を試みたところ、試料と抽出溶媒が混和せずに固化し、抽出操作が困難であった。そこで、アセトニトリルと水を別々に加えることとし、下記の A、B 及び C 法を検討した。

- ・A 法：水 10 mL を加え、30 分静置した後、アセトニトリル 10 mL を加えた。
- ・B 法：水 10 mL を加え、ボルテックスミキサーでかき混ぜた後、アセトニトリル 10 mL を加えた。
- ・C 法：水 10 mL を加え、15 分間超音波処理した後、アセトニトリル 10 mL を加えた。

その結果、A 法では試料によっては、単に水を加えただけでは水と混和しない場合があり、何らかの操作が必要と考えられた。そこでボルテックスミキサーでかき混ぜる B 法及び超音波処理を行う C 法を検討した。その結果、B 法では、遠心沈殿管の壁面に試料が固着する場合があったのに対して、C 法では特に問題なく、水と混和させることが可能であった。

このことから、以後の検討では、脱脂粉乳の場合、C 法により抽出することとした。

なお、メラミン-¹³C₃¹⁵N₃ 内標準液の溶媒はアセトニトリル-水 (1+1) であり、脱脂粉乳に直

接加えると同様に固まってしまったため、アセトニトリルを加えた後に内標準液を加えることとした。また、その他の試料についても同様に、内標準液は試料に直接加えず、アセトニトリル-水 (1+1) を加えた後に加えることとした。

2) 希釈操作の検討

脱脂粉乳にメラミンとして 1 及び 5 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、3.4 の 1) で採用した方法で抽出液を加えた後、3.4 の 1) と同様にカラム処理に供する試料溶液を調製し、以下本法に従って 3 点併行分析を実施した。その結果、メラミンの平均回収率は 1 mg/kg 相当量添加した試料で 86.5 %、5 mg/kg 相当量添加した試料で 92.7 % であり良好であったが、内標準であるメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ の平均回収率が 1 mg/kg 相当量添加した試料で 38.9 %、5 mg/kg 相当量添加した試料で 33.6 % であり、40 % を下回る結果であった。

この原因は夾雑成分を原因とするイオン化抑制であると推定したことから、その影響を軽減し、メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ の回収率を十分に確保するため次の検討を行った。

脱脂粉乳にメラミンとして 1 mg/kg 添加した試料を用い、2.4 の 1) に従い遠心分離まで行った抽出液についてアセトニトリル-水 (1+1) にて 2.5、5 及び 10 倍に希釈し、以下本法に従って 3 点併行分析を実施した。なお、内標準液の添加量はそれぞれ 0.5、1 及び 2 mL とした。

結果を、Table 7 に示した。いずれの希釈倍率においてもメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ の回収率は良好な結果であった。このことから、低濃度でのメラミンの測定を考慮すると希釈倍率は 2.5 倍で十分であると考えられたので、以後の検討では、ミニカラムに負荷する前に 2.5 倍希釈する操作を加えることとした。また、その他の試料についても安全をみて同様に 2.5 倍希釈の操作を加えることとした。

Table 7 Comparison of meramine- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ by dilution level

Kind of sample	Dilution level	Melamine- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$
		Recovery ^{a)} (%)
Dried skim milk	1:2.5	62.2
	1:5	68.7
	1:10	76.1

a) Mean(n=3)

3.6 強酸性陽イオン交換体ミニカラムの溶出画分の確認

強酸性陽イオン交換体ミニカラム処理によるメラミン及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ の溶出画分の確認を行った。

魚粉は、2.4 の 1) の ii に従って抽出を行い、カラム処理に供する試料溶液にメラミンとして 1 mg/kg 相当量を添加した。この抽出液を本法に従ってミニカラムに負荷し、洗浄液であるアセトニトリル及びアセトニトリル-ジエチルアミン (499+1) とミニカラムからの溶出液であるアセトニトリル-ジエチルアミン (49+1) の各溶出画分を確認した。

その結果、Table 8 のとおりアセトニトリル-ジエチルアミン (49+1) 4 mL でほぼ溶出され、内標準も同様の挙動を示すことから、本法では FDA 法⁴⁾と同様にアセトニトリル-ジエチルアミン (49+1) 4 mL で溶出することとした。

Table 8 Elution pattern from strong-acid cation exchange mini column

		Acetonitrile	Acetonitrile- Diethylamine (499+1)	Acetonitrile- Diethylamine (49+1)	
		0~5 mL	0~5 mL	0~4 mL	4~8 mL
Melamine	Area (arb.units)	5445	5735	750553	34429
	Relative value ^{a)} (%)	0.73	0.76	100	4.59
Melamin- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃	Area (arb.units)	35	2432	377565	17802
	Relative value ^{a)} (%)	0.01	0.64	100	4.71

a) Ratio to area of acetonitrile-Diethylamine(49+1) 0~4 mL

3.7 妨害物質の検討

配合飼料（成鶏飼育用，肉豚肥育用，ほ乳期子豚用，にじます育成用），魚粉，ポークチキンミール，米ぬか，大豆油かす，コーングルテンミール及び脱脂粉乳を用い，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。

3.8 添加回収試験

2.1 で調製した配合飼料 2 種類（成鶏飼育用及び肉豚肥育用）及び飼料原料 3 種類（魚粉，大豆油かす及び脱脂粉乳）にメラミンとして 2.5 及び 0.2 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて，本法に従って 3 点併行分析を実施し，回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は，Table 9 のとおり，平均回収率 93.0~117 %，その繰返し精度は，相対標準偏差 (RSD) として 3.6 %以下の成績が得られた。

また，内標準として添加したメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ の回収率は 42.4 %以上であった。

なお，添加回収試験で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig 3 に示した。

Table 9 Recoveries for melamine

Spiked level (mg/kg)	Feed types									
	Formula feed for layer		Formula feed for growing pig		Fish meal		Soybean meal		Dried skim milk	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
2.5	93.0	0.9	95.6	3.1	99.5	1.4	98.0	0.6	96.3	2.9
0.2	115	1.1	112	3.0	112	2.6	117	3.6	109	2.9

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

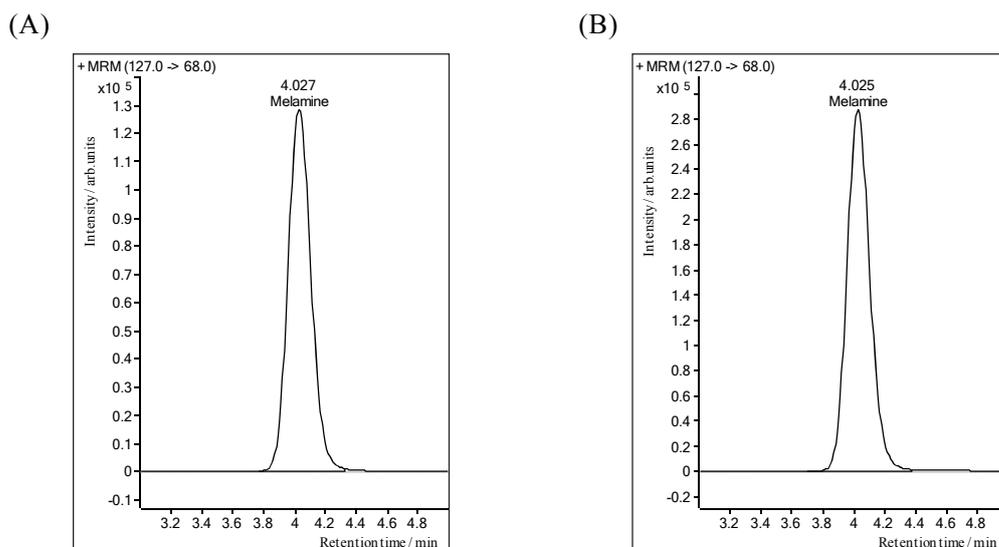


Fig. 3 SRM chromatograms of melamine

(A) Standard solution of melamine (10 ng/mL)

(B) Formula feed for layer spiked melamine at 2.5 mg/kg

3.9 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するために、魚粉及び脱脂粉乳にメラミンを添加し、添加回収試験により得られるピークのSN比が10及び3になる濃度を求めた。

得られたピークのSN比が10以上となる濃度は0.2 mg/kgであった。

確認のために、魚粉及び脱脂粉乳にメラミンとして0.2 mg/kg相当量を添加した試料について、本法により3点併行で定量を行った結果はTable 10のとおりであり、魚粉及び脱脂粉乳において平均回収率は112及び109%，その繰返し精度は相対標準偏差として2.6及び2.9%であった。

また、SN比が3となる濃度は0.06 mg/kgであった。

以上の結果から、本法の定量下限は0.2 mg/kg、検出下限は0.06 mg/kgであった。

Table 10 Recoveries for melamine at the level of limit of quantification

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Fish meal		Dried skim milk	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
0.2	112	2.6	109	2.9

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

4 まとめ

飼料中のメラミンについて、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討し、次の結果を得た。

- 1) 本法は内標準法による定量を採用した。
- 2) 検量線は1~200 ng/mL（注入量として5~1000 pg）の範囲で直線性を示した。

- 3) 試料採取量を 1 g, 抽出溶媒を 20 mL としたところ, 内標準であるメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ の回収率が良好な結果となった.
- 4) 脱脂粉乳では, 抽出操作について, 水を加えてなじませた後に, アセトニトリル及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 内標準液を加えることとした.
- 5) ミニカラムに負荷する前に 2.5 倍希釈する操作を加えることにより, 内標準であるメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ の回収率が良好な結果となった.
- 6) 強酸性陽イオン交換体ミニカラムからの溶出面分を確認した結果, 溶出液量は 4 mL で十分であった.
- 7) 4 種類の配合飼料及び 6 種類の飼料原料について, 本法に従ってクロマトグラムを作成したところ, メラミンの定量を妨げるピークは認められなかった.
- 8) 配合飼料 2 種類 (成鶏飼育用及び肉豚肥育用) 及び飼料原料 3 種類 (魚粉, 大豆油かす及び脱脂粉乳) にメラミンとして 2.5 及び 0.2 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて, 本法に従って 3 点併行分析を実施したところ, 平均回収率 93.0~117 %, その繰返し精度は, 相対標準偏差 (RSD) として 3.6 %以下の成績が得られた.
- 9) 本法によるメラミンの定量下限は, 試料中で 0.2 mg/kg, 検出下限は 0.06 mg/kg であった.

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) Jonathan J. Litzau, Gregory E. Mercer and Kevin J. Mulligan: GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide, and Cyanuric Acid, U.S Food and Drug Administration, Laboratory Information Bulletin LIB 4423(24), (2008).
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 : 食品中のメラミンの試験法について, 平成 20 年 10 月 2 日, 食安監発第 1002003 号 (2008).
- 4) Michael Smoker and Alexander J. Krynitsky: Interim Method for Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues In Foods using LC-MS/MS: Version1.0, U.S Food and Drug Administration, Laboratory Information Bulletin LIB 4422, (2008).
- 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, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).