

技術レポート

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の共同試験

大島 慎司*

Collaborative Study of Melamine in Feeds by LC-MS/MS

Shinji OSHIMA*

(*Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan))

1 緒言

食品及び飼料中のメラミンの基準値については、コーデックス規格として 2.5 mg/kg が採択されている。また国内における飼料中の基準値は、「尿素を除く飼料(飼料原料を含む.)」について 2.5 mg/kg となっている²⁾。

そのため、当センターにおいて、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¹⁾を開発したところであるが、更に今回、共通試料を用いた共同試験を行ったので、その結果を報告する。

2 実験方法

2.1 分析試料

市販の成鶏飼育用配合飼料、魚粉及び脱脂粉乳をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎し、供試試料とした。なお、試験に用いた成鶏飼育用配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Composition of the formula feed

Formula feed type	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

* 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 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

2.2 定量方法

2.1 で調製した各試料について飼料分析基準³⁾第7章7により2点併行分析を行った。

なお、メラミンの定量値は、mg/kg 単位で有効数字4桁目を四捨五入し、有効数字3桁とした。

3 結果及び考察

成鶏飼育用配合飼料にメラミンとして0.4 mg/kg 相当量(1 mL 中に4 µg を含有する標準液0.1 mL 添加)、魚粉及び脱脂粉乳にメラミンとして1 mg/kg 相当量(1 mL 中に10 µg を含有する標準液0.1 mL 添加)を添加した試料を用い、財団法人日本食品分析センター彩都研究所、協同飼料株式会社研究所、日本ハム株式会社中央研究所、日本ウォーターズ株式会社、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、同神戸センター及び同福岡センターの9試験室において共同試験を実施した。結果の解析については、IUPACのプロトコール⁴⁾に従い、Cochran 検定、外れ値1個のGrubbs 検定及び外れ値2個のGrubbs 検定を行い、平均回収率、繰返し精度(RSD_F)及び室間再現精度(RSD_R)を算出した。得られたRSD_Rから、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

その結果を Table 2 に示した。成鶏飼育用配合飼料の平均回収率は97.1 %、その繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差(RSD_F及びRSD_R)として4.2 %及び6.3 %であり、HorRat は0.34であった。魚粉では平均回収率は97.8 %、その繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれRSD_F及びRSD_Rとして3.9 %及び7.0 %であり、HorRat は0.44であった。脱脂粉乳では平均回収率は99.3 %、その繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれRSD_F及びRSD_Rとして4.7 %及び6.4 %であり、HorRat は0.40であった。

参考のため、各試験室で使用した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計の機種等を Table 3 に示した。

Table 2 Collaborative study for melamine

Lab. No.	Feed types					
	Formula feed for layer (mg/kg)		Fish meal (mg/kg)		Dried skim milk (mg/kg)	
1	0.346	0.346	0.851	0.909	0.915	0.830
2	0.366	0.399	0.944	0.955	0.948	1.04
3	0.399	0.405	0.992	0.982	0.987	1.01
4	0.385	0.395	1.05	0.937	1.03	0.926
5	0.362	0.404	0.957	0.980	1.01	1.06
6	0.410	0.432	1.13	1.04	0.998	1.02
7	0.376	0.375	0.905	0.932	1.04	1.01
8	0.398	0.422	1.06	1.05	1.07	1.05
9	0.372	0.401	0.969	0.956	1.01	0.915
Spiked level (mg/kg)	0.4		1.0		1.0	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.389		0.978		0.993	
Recovery ^{a)} (%)	97.1		97.8		99.3	
RSD _r ^{b)} (%)	4.2		3.9		4.7	
RSD _R ^{c)} (%)	6.3		7.0		6.4	
PRSD _R ^{d)} (%)	18		16		16	
HorRat	0.34		0.44		0.40	

a) $n=18$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 3 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC	MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Waters Alliance 2695	Waters Micromass Quattro micro API	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×100 mm, 3.5 μm)
2	Agilent Technologies 1200 series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×150 mm, 5 μm)
3	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×100 mm, 3.5 μm)
4	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×150 mm, 5 μm)
5	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×150 mm, 5 μm)
6	Waters Alliance 2695	Waters Quattro Premier XE	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×150 mm, 5 μm)
7	Agilent Technologies 1200 series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX RX-S (2.1×150 mm, 5 μm)
8	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	MERCK SeQuant ZIC-HILIC (2.1×150 mm, 5 μm)
9	Agilent Technologies 1200 series	Applied Biosystems API 3000	Waters Atlantis HILIC Silica (2.1×150 mm, 3 μm)

4 まとめ

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の繰返し精度及び室間再現精度を確認するため、成鶏飼育用配合飼料、魚粉及び脱脂粉乳を用いて、9試験室において、共同試験を実施した。その結果、成鶏飼育用配合飼料の平均回収率は97.1%、その繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（ RSD_r 及び RSD_R ）として4.2%及び6.3%であり、HorRatは0.34であった。魚粉では平均回収率は97.8%、その繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として3.9%及び7.0%であり、HorRatは0.44であった。脱脂粉乳では平均回収率は99.3%、その繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として4.7%及び6.4%であり、HorRatは0.40であった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた財団法人日本食品分析センター彩都研究所、協同飼料株式会社研究所、日本ハム株式会社中央研究所、日本ウォーターズ株式会社における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 大島慎司：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，飼料研究報告，36，1-12 (2011)。
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：「飼料の有害物質の指導基準」の一部改正について，平成24年4月9日，23消安6540号 (2012)。

- 3) 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).
- 4) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995).