

7 ヘリウムを使用しない代替法の検討

(2) 愛玩動物用飼料中の無機砒素のヘリウムを使用しない代替法の検討

門屋 日菜*, 橋本 良美*

Study of Alternative Determination Method without Helium (2) Alternative Determination Method of Inorganic Arsenic in Pet Food

KADOYA Hina* and HASHIMOTO Yoshimi*

(*¹ Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

For a determination method of inorganic arsenic, which is listed in the Inspection Method for Pet Food of Japan, we have studied an alternative method that does not use helium (collision gas) of a liquid-chromatograph inductively-coupled-plasma mass spectrometer (LC-ICP-MS).

Having added 2 w/v% tetramethyl ammonium hydroxide (TMAH) solution to a sample, inorganic arsenic was extracted by heating. The extract was diluted with water and adjusted to about pH 3 with 0.3 mol/L nitric acid, and then injected into a LC-ICP-MS to determine the concentration of inorganic arsenic. LC separation was then carried out on an ODS column (CAPCELL PAK C18 MG, 4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm, Osaka Soda Co. Ltd.; Osaka, Japan) with 10 mmol/L sodium 1-butanefulfonate, 4 mmol/L malonic acid, 4 mmol/L TMAH and 0.05% methanol solution as a mobile phase. Besides, LC-ICP-MS measurement was conducted by a method that did not use helium as the collision gas.

A study of interfering substances in LC-ICP-MS measurement was conducted on pet food samples. As a result, no peaks that interfere with the selectivity of inorganic arsenic were observed in any of the samples. Furthermore, a matrix effect study of inorganic arsenic was conducted. The peak area ratio of a matrix standard solution, prepared by adding standard solution to blank sample solution, and that of the standard solution of the same concentration, was calculated. As a result, a dried jerky sample was diluted two-fold to reduce the matrix effect, allowing for unaffected determination. For other pet foods, the matrix had no significant effect on the measurement values.

Key words: inorganic arsenic; liquid-chromatograph inductively-coupled-plasma mass spectrometer (LC-ICP-MS); helium; pet food

キーワード：無機砒素；液体クロマトグラフ誘導結合プラズマ質量分析計；ヘリウム；愛玩動物用飼料

1 緒 言

愛玩動物用飼料中の無機砒素は、愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令¹⁾において無機砒素(III) (以下「As(III)」という。)及び無機砒素(V) (以下「As(V)」という。)の総和として2 μg/gの基準値が定められている。この分析法として、愛玩動物用飼料等の検査法²⁾に液体クロマトグラフ誘導結合プラズマ質量分析計(以下「LC-ICP-MS」という。)による分析法が収載されており(以下「収載法」という。), コリジョンガスとしてヘリウムを使用し、測定を行って

* 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

いる。

我が国では近年、ヘリウムの入手が困難である状況が長期化しており、今後も安定供給の見通しが立っていない。そこで、愛玩動物用飼料の無機砒素の LC-ICP-MS による分析法について、ヘリウム（コリジョンガス）を用いない代替法を検討したので、その概要を報告する。

参考に、分析対象とした無機砒素の構造式等を Fig. 1 に示した。

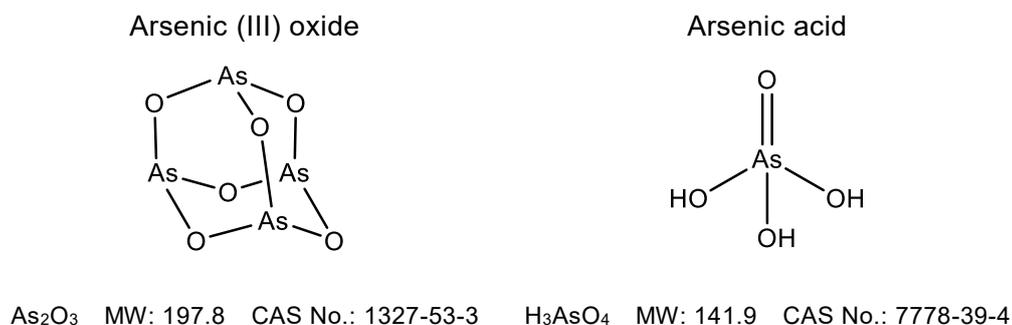


Fig. 1 Chemical structures of arsenic compounds

2 実験方法

2.1 試料

ドライ製品（犬用及び猫用），セミドライ製品（犬用），ウェット製品（犬用），成型ジャーキー（犬用），素材乾燥ジャーキーのハードタイプ及びソフトタイプ（犬用及び猫用），菓子類（犬用）並びに粉ミルク（猫用）を検討に用いた。有姿のままでは粉砕が困難なジャーキーは、はさみ等を用いて細断したのち、回転刃による粉砕機で粉砕し、粉砕が不十分と思われるものについては 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し、分析用試料とした。ウェット製品はフードプロセッサで粉砕し、分析用試料とした。粉ミルクは粉砕を行わなかった。その他の試料はそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し、分析用試料とした。

検討に用いた愛玩動物用飼料を Table 1 に示した。なお、原材料名は、検討に用いた各試料に表記されていた名称に準拠した。

Table 1 Ingredients list of pet foods

Pet food types	Ingredients
Dry food for dogs	Chicken, barley, corn, wheat, pea bran, corn gluten, milo, cellulose, chicken extract, vegetable oil, beet pulp, flaxseed, pork extract, wheat bran, oat fiber, apple, broccoli, carrot, cranberry, pea beans, minerals (calcium, sodium, potassium, chloride, copper, iron, manganese, selenium, zinc, iodine), lactic acid, amino acids (taurine, lysine), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, beta carotene, niacin, pantothenic acid, folic acid, biotin, choline), antioxidants (mixed tocopherols, rosemary extract, green tea extract), carnitine
Dry food for cats	Raw beef, raw beef liver, fish meal, peas, tapioca starch, whole flaxseed, chicken fat, natural flavors, dried beef, vinegar, canola, minerals (potassium chloride, sodium chloride, calcium carbonate, zinc sulfate, iron sulfate, manganese sulfate, sodium selenite, cobalt sulfate, calcium iodate), vitamins (choline chloride, niacin, vitamin E supplement, calcium pantothenate, riboflavin supplement, thiamine nitrate, pyridoxine hydrochloride, vitamin A supplement, biotin, vitamin B ₁₂ supplement, folic acid, vitamin K ₁ supplement, vitamin B ₃ supplement), taurine, antioxidants (natural mixed tocopherols, citric acid, rosemary extract, green tea extract, spearmint extract)
Semi-dry food for dogs	Grains (corn, wheat flour, defatted rice bran, corn gluten feed, wheat protein), meats (chicken meal, chicken, beef flour, pork flour, chicken liver powder, chicken fillet, beef), defatted soybeans, fats and oils (animal fat, vegetable oil (including omega-6 fatty acids)), beer yeast, salt, sugars (sucrose, oligosaccharides), selenium yeast, vegetables (cabbage, barley grass, pumpkin, tomato, carrot, broccoli, spinach, molokheiya), small fish powder, casein phosphopeptide, propylene glycol, minerals (calcium, phosphorus, sodium, chloride, iron, copper, manganese, zinc, iodine, cobalt), pH adjuster, preservatives (potassium sorbate, sodium dehydroacetate), glycerin, sorbitol, vitamins (A, B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, pantothenic acid, choline), swelling agent, antioxidants (sodium erythorbate, mixed tocopherol, rosemary extract), food colors (titanium dioxide, food red no.102, food red no.106, food yellow no.4, food yellow no.5, food blue no.1), glucosamine, amino acids (arginine, methionine), chondroitin
Wet food for dogs 1	Pork, rice, tomato, radish, komatsuna, corn, wood ear mushroom, olive oil
Wet food for dogs 2	Meats (chicken, lamb, chicken breast, etc.), vitamins, minerals, polysaccharide, phosphate (Na), food color (titanium dioxide), EDTA-Ca/Na
Formed jerky for dogs 1	Cereals, meats [beef, cartilage (including collagen), etc.], vegetables (carrots, pumpkin, etc.), dietary fiber, lactic acid bacteria, thickening stabilizer (glycerin), preservative (potassium sorbate), food colors (red 40, yellow 4)
Formed jerky for dogs 2	Beef liver, beef tongue
Formed jerky for dogs 3	Meats (chicken, beef), rice bran, modified starch, wheat flour, sucrose, salt, propylene glycol, stabilizer (sorbitol), antioxidant (sodium erythorbate), preservatives (sodium dehydroacetate, potassium sorbate), color former (sodium nitrite), pH adjuster, food colors (titanium dioxide, red 106)
Formed jerky for dogs 4	Meats (chicken, beef), defatted soybeans, wheat flour, wheat protein, D-sorbitol, glycerin, sodium lactate, minerals (Ca, P), salt, phosphates (Na, K), seasonings, preservative (sorbic acid), antioxidants (extracted vitamin E, sodium vitamin C), fragrance, color former (sodium nitrite), food color (red 40)

Table 1 Ingredients list of pet foods (continued)

Pet food types	Ingredients
Dried jerky for dogs (hard type) 1	Chicken fillet, starch, powdered egg white, trehalose, minerals (sodium, calcium), phosphate (Na)
Dried jerky for dogs (hard type) 2	Chicken breast
Dried jerky for dogs (hard type) 3	Horse lung
Dried jerky for dogs (hard type) 4	Venison
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 1	Sika deer
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 2	Chicken fillet
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 3	Beef tongue skin
Dried jerky for dogs and cats (hard type) 4	Venison
Dried jerky for dogs (soft type) 1	Chicken fillet, glycerin, quality preservation agent (propylene glycol), sodium hexametaphosphate, preservatives (potassium sorbate, sodium tehydroacetate), salt, antioxidant (sodium erythorbate), sodium polyphosphate, color former (sodium nitrite)
Dried jerky for dogs (soft type) 2	Chicken fillet, thickening stabilizers (glycerin, sorbitol), sodium lactate, pH adjuster, minerals (sodium chloride), preservative (potassium sorbate), antioxidant (sodium pyrosulfite), oligosaccharide, fish cartilage extract substance (containing chondroitin), glucosamine
Dried jerky for dogs (soft type) 3	Chicken, salt, glycerin (humectant), propylene glycol (quality preservation agent), color former (sodium nitrite)
Confectionery for dogs	Flour, sugar, starch, vegetable oil, skim milk powder, oligosaccharide, calcium carbonate, cheese
Milk powder for cats	Dried whey protein concentrate, dried whey powder, animal and vegetable oils, glucose, lecithin, taurine, starch, lactoferrin, probiotics (<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>), fragrance, silicon, vitamins (A, B ₁ hydrochloride, B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , calcium pantothenate, C, D ₃ , E, choline chloride, niacin, biotin, folic acid), minerals (dicalcium phosphate, calcium carbonate, ferrous glycine, ferrous sulfate, copper sulfate, manganese sulfate, sodium selenite, zinc oxide, cobalt sulfate)

2.2 試薬

- メタノールは LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製), 硝酸は Ultrapur-100 (関東化学製), 25 w/v% 水酸化テトラメチルアンモニウム (以下「TMAH」という.) は超高純度分析用 (多摩化学工業製), 0.1 w/v% メチルオレンジ溶液は中和滴定用 (富士フィルム和光純薬製), 1-ブタンスルホン酸ナトリウムは東京化成工業製, マロン酸は特級 (富士フィルム和光純薬製) を用いた. 水は Milli-Q Integral 5 (Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた.
- 2 w/v% TMAH
25 w/v% TMAH 8 mL に水を加えて 100 mL とした.

3) 0.3 mol/L 硝酸

硝酸 1.92 mL に水を加えて 100 mL とした。

4) 溶離液 (10 mmol/L 1-ブタンスルホン酸ナトリウム・4 mmol/L マロン酸・4 mmol/L TMAH・0.05 %メタノール溶液)

1-ブタンスルホン酸ナトリウム 1.602 g, マロン酸 0.416 g, 25 w/v% THAH 1.458 g を水に溶かし, メタノール 0.5 mL を加えて, 硝酸で pH 3.0 (2.95~3.04) に調整した後, 更に水を加えて 1 L とした。

5) As (III) 標準液

砒素 (III) 標準液 (富士フィルム和光純薬製, 保証値 1001 mg/L) 1 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れ, 標線まで水を加えて As (III) 標準液を調製した (この液 1 mL は, As (III) として 100 µg 含有)。

6) As (V) 標準液

砒素 (V) 標準液 (メルク製, 保証値 1002 mg/L) 1 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れ, 標線まで水を加えて As (V) 標準液を調製した (この液 1 mL は, As (V) として 100 µg 含有)。

7) 砒素混合標準原液

As (III) 標準液及び As (V) 標準液各 0.5 mL を正確に 50 mL の全量フラスコに入れ, 標線まで水を加えて砒素混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, As (III) 及び As (V) をそれぞれ As として 1 µg 含有)。

8) 砒素混合標準液

溶離液 25 mL を入れた 50 mL の全量フラスコに, 砒素混合標準液 50, 125, 250, 375 又は 500 µL をそれぞれ正確に入れ, 0.1 w/v%メチルオレンジ水溶液数滴及び 2 w/v% TMAH 5 mL を加えて 0.3 mol/L 硝酸で pH を約 3 (オレンジ色) に調整した後, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中に As としてそれぞれ 1, 2.5, 5, 7.5 及び 10 ng を含有する砒素混合標準液を調製した。

同時に砒素混合標準液を加えずに同様に操作し, 濃度 0 ng/mL の標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機 :

粉砕機 1 (ドライ製品, セミドライ製品, 菓子類及び一部のジャーキー用) :

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

粉砕機 2 (ジャーキー用) :

GM 200 Retsch 製 (使用時回転数 10000 rpm)

2) フードプロセッサー : MK-K58 パナソニック製

3) 遠心沈殿管 : 15 mL Metal free centrifuge Labcon 製

4) スポイト : エコノスポイト 3 mL サンプラテック製

5) メンブランフィルター : Millex-HP Merck Millipore 製 (孔径 0.45 µm, 直径 33 mm, PES)

6) バイアル瓶 : 2 mL Target DP vial, PP Thermo Fisher Scientific 製

7) LC-ICP-MS :

液体クロマトグラフ部 : UltiMate 3000 Thermo Fisher Scientific 製

誘導結合プラズマ質量分析計部 : iCAP Qc Thermo Fisher Scientific 製

2.4 定量方法

コリジョンガス未使用時の誘導結合プラズマ質量分析計部の測定条件以外は、愛玩動物用飼料等の検査法第4章4.1に従った。

1) 抽出

分析試料 0.5 g を量って 15 mL の遠心沈殿管に入れ、2 w/v% TMAH 5 mL を加えて振り混ぜた。これをドライブロックバスを用いて 100 °C で 2 時間加熱して抽出した後放冷した。

抽出液に水 5 mL を加えて振り混ぜた後、2100×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を 50 mL の全量フラスコに入れた。遠心沈殿管の残さに水 12.5 mL を加えて振り混ぜた後、2100×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに加える操作を 2 回繰り返した。先の全量フラスコに 0.1 w/v% メチルオレンジ溶液数滴を加え、0.3 mol/L 硝酸で pH を約 3 (オレンジ色) に調整した後、標線まで水を加えた。この液の一定量を 7380×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をメンブランフィルターでろ過し、LC-ICP-MS による測定に供する試料溶液とした。

同時に試料を用いないで同一操作を行い、空試験溶液を調製した。

2) LC-ICP-MS による測定

試料溶液、空試験溶液及び各砒素混合標準液各 20 µL を LC-ICP-MS に注入し、選択イオン検出 (以下「SIM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件は Table 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operating conditions of LC

Column	CAPCELL PAK C18 MG (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 µm), Osaka Soda
Mobile phase	10 mmol/L sodium 1-butanefulfonate / 4 mmol/L malonic acid / 4 mmol/L TMAH / 0.05% methanol solution (pH 3.0)
Flow rate	0.75 mL/min
Column temperature	30 °C

Table 3-1 Operating conditions of ICP-MS with collision gas (Gas conditions are an example.)

Nebulizer gas	Ar (1.10 L/min)
Plasma gas	Ar (14.0 L/min)
Auxiliary gas	Ar (0.80 L/min)
Collision gas	He (4.3 L/min)
High-frequency output	1550 W
Monitor ion	<i>m/z</i> 75

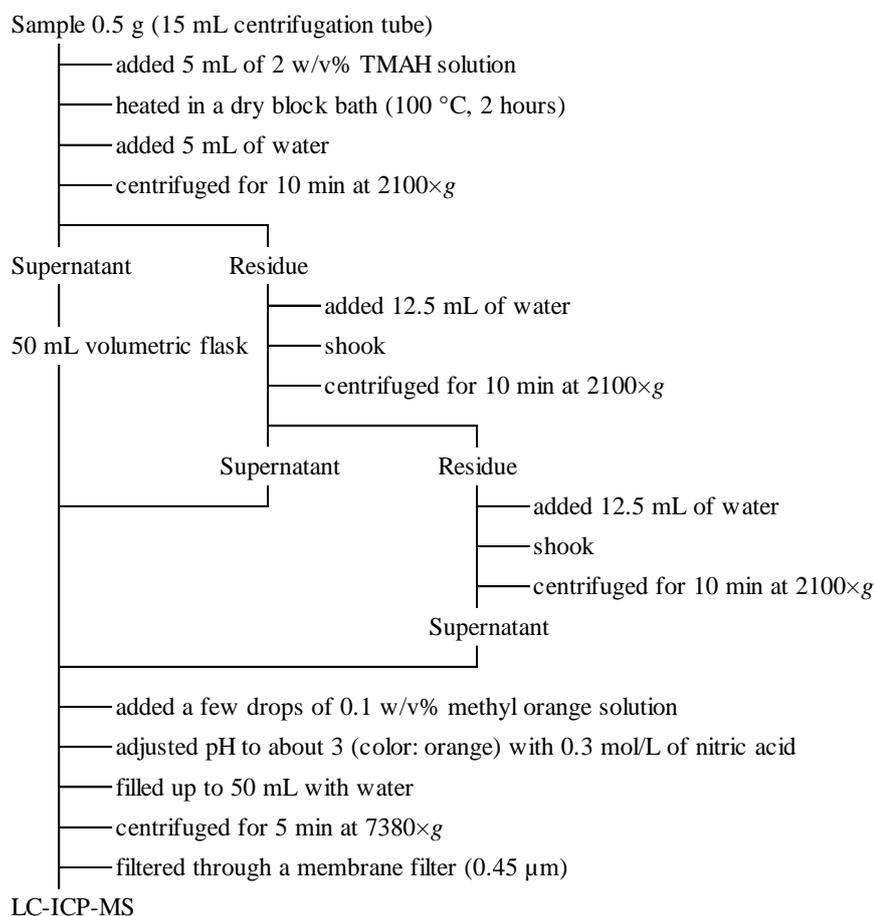
Table 3-2 Operating conditions of ICP-MS without collision gas (Gas conditions are an example.)

Nebulizer gas	Ar (1.10 L/min)
Plasma gas	Ar (14.0 L/min)
Auxiliary gas	Ar (0.80 L/min)
High-frequency output	1550 W
Monitor ion	<i>m/z</i> 75

3) 計 算

得られた SIM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の As (III) 及び As (V) を算出した。なお、空試験溶液について、ピークが認められた場合は結果を差し引いた。

定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for inorganic arsenic in pet food

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 8)により調製した各標準液 20 µL をコリジョンガス未使用で LC-ICP-MS に注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。得られた検量線は Fig. 2-1 及び Fig. 2-2 のとおりであり、1~10 ng/mL (注入量として 0.02~0.2 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、As (III) 及び As (V) として 0.1~1 mg/kg を含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の濃度範囲に相当する。

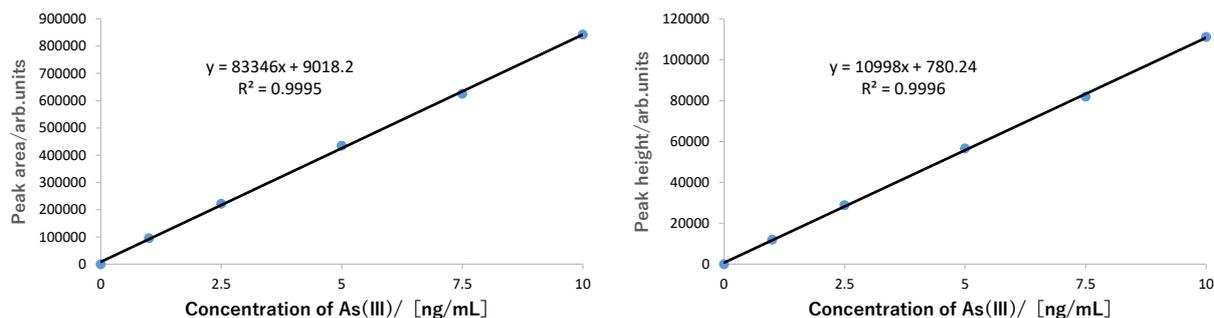


Fig. 2-1 Calibration curves of arsenic (III) oxide (As(III)) by peak area (left) and peak height (right)

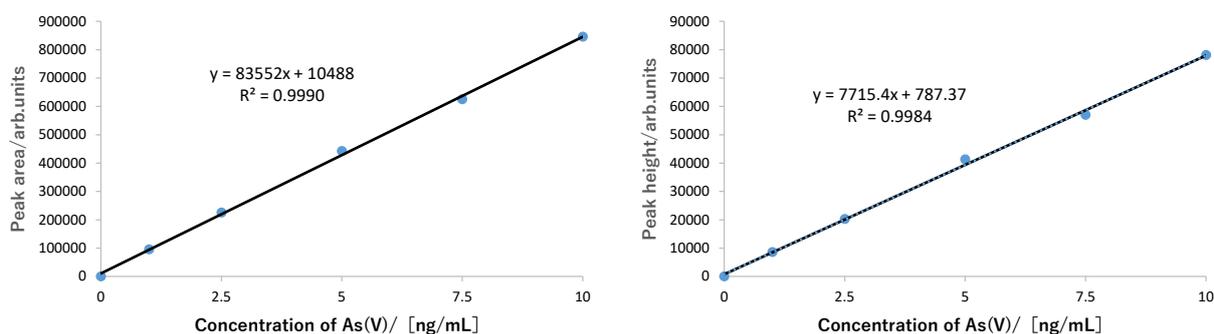


Fig. 2-2 Calibration curves of arsenic acid (As(V)) by peak area (left) and peak height (right)

3.2 妨害物質の検討

Table 1 の愛玩動物用飼料を用い、2.4 の 1)により調製した試料溶液をコリジョンガス未使用で LC-ICP-MS に注入し、得られた SIM クロマトグラムを確認したところ、セミドライ製品（犬用）、ウェット製品（犬用）2 及び成型ジャーキー（犬用）3 について As (V) と同じ保持時間に検出下限以上のピークが認められた（含有量としてそれぞれ 0.057 mg/kg, 0.097 mg/kg 及び 0.18 mg/kg）。

そこで、検出された試料について、収載法に従いコリジョンガスを使用して As (V) の測定を行った。その結果、同様にピークが認められ、それぞれの含有量はセミドライ製品（犬用）で 0.056 mg/kg, ウェット製品（犬用）2 で 0.10 mg/kg, 成型ジャーキー（犬用）3 で 0.19 mg/kg であった。コリジョンガス未使用時と使用時で結果に大きな差が認められなかったことから、同じ保持時間に認められたピークは自然汚染の As (V) のピークと考えられ、いずれの試料においても各砒素の定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

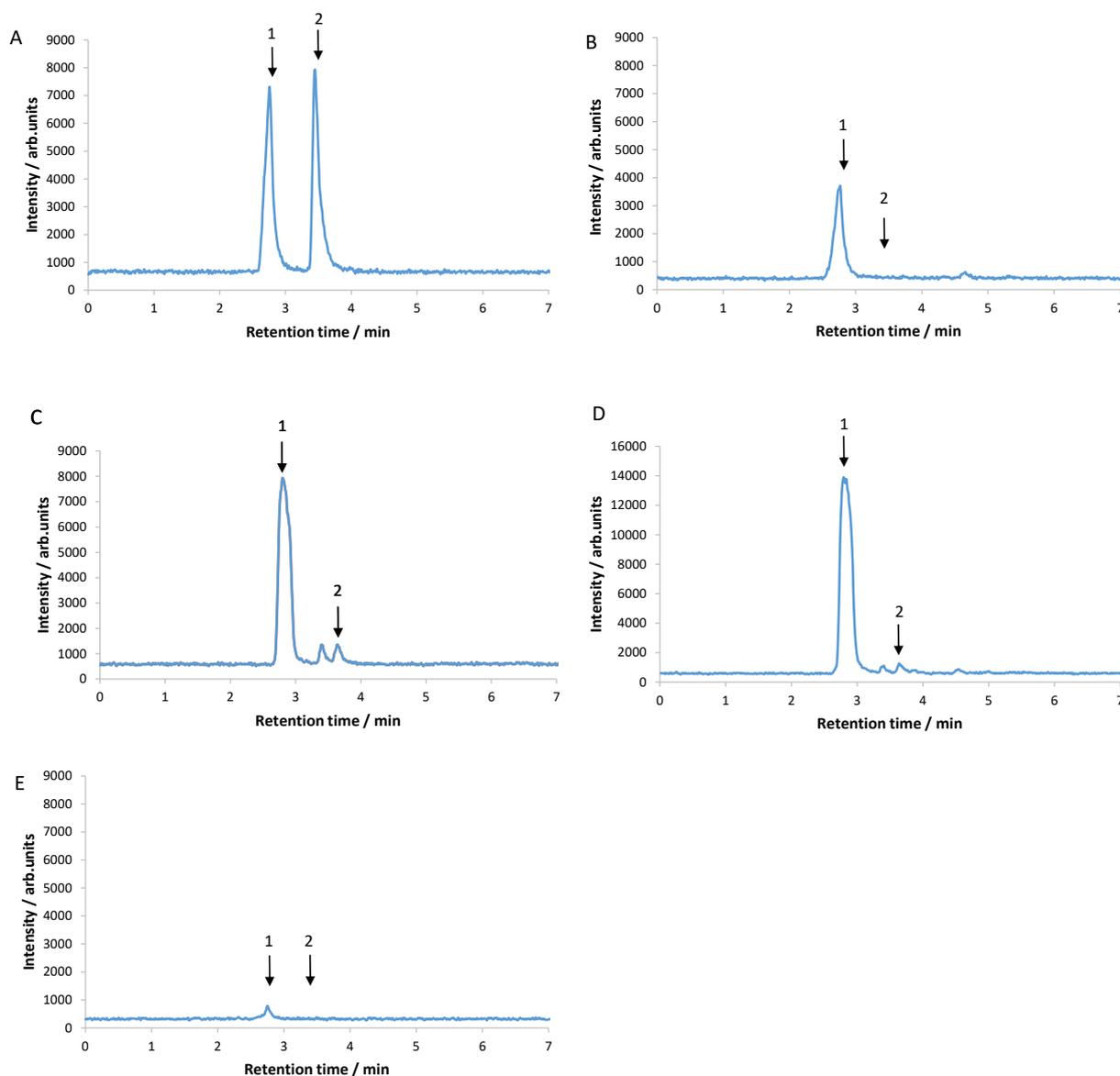


Fig. 3 Typical selected ion monitoring chromatograms of standard and blank sample solutions (Arrows indicate the retention times of 1: As(V), 2: As(III))

A: Standard solution (1 ng/mL as each As)

B~I: Blank or naturally contaminated sample solutions (B: semi-dry food for dogs, C: wet food for dogs 2, D: formed jerky for dogs 3, E: confectionery for dogs)

3.3 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)により調製した Table 1 のドライ製品 (犬用), セミドライ製品 (犬用), ウェット製品 (犬用) 1, 成型ジャーキー (犬用) 1, 素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ) (犬用) 1, 素材乾燥ジャーキー (ソフトタイプ) (犬用) 1, 菓子類 (犬用) 及び粉ミルク (猫用) のブランク試料溶液に As (III) 及び As (V) をそれぞれ 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 20 ng/mL 相当量) を添加した各マトリックス標準液について, 2.2 の 8)に従って調製した同濃度の各砒素標準液に対するピーク面積比を確認したところ, Table 4 のとおりであり, 素材乾燥ジャーキーの As (III) 以外については試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。

素材乾燥ジャーキーの As (III) についてイオン化を抑制するマトリックス効果が認められたため、これを低減するため試料溶液を超純水で 2 倍希釈して測定した。併せて、イオン化抑制がコリジョンガスの有無によるものであるかを確認するため、コリジョンガスを使用し測定を行った。その結果、コリジョンガスを使用した場合においてもイオン化を抑制するマトリックス効果が認められたが、コリジョンガスの使用の有無にかかわらず、試料溶液を希釈することによりマトリックス効果による影響を受けずに測定が可能であった。

なお、各マトリックス標準液のピーク面積は各試料ブランクの平均ピーク面積を差し引いて算出した。

Table 4 Matrix effect study

Pet food types	Matrix effect ^{a)} (%)			
	Helium (collision gas) not used		Helium (collision gas) used	
	As (III)	As (V)	As (III)	As (V)
Dry food for dogs	99.2	103	—	—
Semi-dry food for dogs	102	104	—	—
Wet food for dogs 1	89.7	88.4	—	—
Formed jerky for dogs 1	99.0	101	—	—
Dried jerky for dogs (hard type) 1	78.7	89.5	89.1	85.3
	95.0 ^{b)}	91.3 ^{b)}	99.1 ^{b)}	92.9 ^{b)}
Dried jerky for dogs (soft type) 1	73.8	88.7	79.7	82.2
	93.0 ^{b)}	94.4 ^{b)}	95.2 ^{b)}	91.6 ^{b)}
Confectionery for dogs	102	107	—	—
Milk powder for cats	97.0	107	—	—

—: Not tested

$n = 3$

a) Ratio of peak area of arsenic in the presence of matrix (as 20 ng/mL: 2 mg/kg in sample) to that in the absence of matrix

b) Double dilution

4 まとめ

愛玩動物用飼料中の無機砒素の LC-ICP-MS による分析法について、コリジョンガスを用いない方法を検討したところ、以下の結果が得られ、測定が可能であると考えられた。なお、素材乾燥ジャーキー中の As (III) については、マトリックスによる影響を低減するため最終試料溶液を 2 倍希釈することで測定が可能であった。

- 1) 検量線はそれぞれ 1~10 ng/mL (注入量として 0.02~0.2 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、As (III) 及び As (V) として 0.1~1 mg/kg を含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の濃度範囲に相当する。
- 2) 愛玩動物用飼料について、コリジョンガス未使用時に得られたクロマトグラムには、選択性を妨げるピークは認められなかった。

- 3) コリジョンガス未使用時に得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。

文 献

- 1) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 2 号（2021）
- 2) 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).