

# MALDI-TOF 質量分析計を用いた羊毛とその他の獣毛の混用率の算出 (第 2 報)

渡辺 惣汰\*, 永田 栞\*, 鈴木 洋介\*, 大類 仁\*

## Calculation of the mixing ratio of wool and other animal hair in yarn using a MALDI-TOF mass spectrometer (Second report)

WATANABE Sota\*, NAGATA Shiori\*, SUZUKI Yosuke\* and ORUI Hitoshi\*

\*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, 277-0882 Japan

In Chapter 51 of the Customs Tariff Schedules, there is a disparity in the tariff rate depending on whether yarn not for retail sale is made of wool or other animal hair. Also, yarns made from multiple animal hairs have different tariff rates depending on the mixing ratio of wool. To classify them for the tariff, it is important to identify the animal species of raw fibers of yarn and to calculate the mixing ratio of wool in yarn. Referring to previous studies and JIS L 1030-3-1, we considered the establishment of an analytical method that can easily differentiate animal hair and calculate the mixing rate. As a result, using a simple purification procedure, it was possible to differentiate the raw materials of yarn with less time and cost than JIS L 1030-3-1, and it was possible to obtain the approximate mixing ratio of wool. In the future, it is expected to be used as a simple analysis method that can quickly provide information that contributes to tariff classification.

### 1. 緒 言

繊維製品である毛糸は、天然繊維や化学繊維を紡績して作られる。獣毛は天然繊維の一種であり、羊、やぎ、やく、アルパカ、らくだ、うさぎ等の毛が毛糸の原料として使用されている。

関税率表第 51 類において、羊毛とその他の獣毛製の小売用ではない毛糸には、特惠税率等で税率格差がある。また、羊毛を含む複数種の獣毛が混在するものの場合、第 11 部注 2(A) の規定より、「構成する紡織用繊維のうち最大の重量を占めるもののみから成る物品とみなしてその所属を決定する」ことになる。したがって、適正に関税分類するためには、毛糸の原料となった獣毛を鑑別し、羊毛の混用率を算出する必要がある。

繊維製品中の獣毛の鑑別及び混用率の分析法として、JIS L 1030-3-1 がある（以下、JIS 法と略記する。）。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した獣毛由来のケラチンをトリプシン処理によって切断し、ペプチド断片をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（以下、MALDI-TOF MS と略記する。）で測定する方法であり、様々な動物種の獣毛が鑑別可能で、それらの混用率も算出できる<sup>1)</sup>。

第 1 報では、排出転写方式の電気泳動装置を活用して JIS 法と同等の分析が可能であるか検証した。一部の獣毛について鑑別可能なマススペクトルが得られたものの、JIS 法に列挙されている動物種特異的ピークは認められず、SN 比についても十分な結果

が得られなかった<sup>2)</sup>。第 2 報では、先行研究<sup>3)</sup>を参考に、電気泳動によるケラチンの精製を省略することで、簡易的に獣毛の鑑別及び羊毛の混用率測定が可能か検証した。その結果、適正に関税分類するための知見が得られたので報告する。

### 2. 実 験

#### 2.1 試料及び試薬

##### 2.1.1 試料

市販の毛糸（単一種の獣毛 100% と成分表記があるもの）：6 種類（羊、やぎ、やく、アルパカ、らくだ及びうさぎ）

市販の毛糸（複数の成分表記があるもの）：4 種類 (A-D)。成分表記の内訳は以下の通り。

A : 羊 75%, やぎ 23%, ナイロン 2%

B : 羊 80%, アルパカ 20%

C : うさぎ 47%, 羊 30%, ナイロン 13%, やぎ 10%

D : 羊 53%, アルパカ 40%, らくだ及びやく 7%

##### 2.1.2 試薬

ドデシル硫酸ナトリウム（以下、「SDS」と略記する。）、リン酸二水素ナトリウム二水和物、リン酸水素二ナトリウム十二水和物、アセトン、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸（以上、富士フイルム和光純薬）

D,L-ジチオスレイトール（以下、DTT と略記する。）、ヨードアセトアミド（以下、IAA と略記する。）、トリプシン（ブタ膵臓由

\* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

来) (以上, シグマ アルドリッチ)

重炭酸アンモニウム (MP Biomedicals)

$\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸 (5 mg が 1.5 mL マイクロチューブに計量済みのもの. 以下, CHCA と略記する.) (島津製作所)

PEPTIDE CALIBRATION STANDARD (BRUKER)

## 2.2 装置

|              |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| 冷凍粉碎機        | : JFC-300 (日本分析工業社)                 |
| ミキサーミル       | : MM-300 (Retsch 社)                 |
| ブロックバス       | : Thermomixer comfort (Eppendorf 社) |
| 遠心分離機        | : MX-305 (トミー精工社)                   |
| 乾燥機          | : MOV212F (山洋電機社)                   |
| MALDI-TOF MS | : MALDI-8020 (島津製作所社)               |

## 2.3 試薬の調製

### ・4 % SDS を含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.8)

リン酸水素二ナトリウム十二水和物を 28.4 g, リン酸二水素ナトリウム二水和物を 15.6 g それぞれ超純水に溶かして全量を 500 mL とした. リン酸水素二ナトリウム水溶液を 100 mL 量り取り, 攪拌しながらリン酸二水素ナトリウム水溶液を徐々に加え, pH を 7.8 に調整した. 400 mg の SDS を調製したリン酸緩衝液に溶かし, 全量を 10 mL とした.

### ・DTT 溶液

1.9 mg/10  $\mu$ L となるように DTT を超純水に溶解した.

### ・IAA 溶液

4.7 mg/50  $\mu$ L となるように IAA を超純水に溶解した.

### ・50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液

79.06 mg の重炭酸アンモニウムを超純水に溶かし, 全量を 20 mL とした.

### ・トリプシン溶液

2  $\mu$ g/30  $\mu$ L となるようにトリプシンを 50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液に溶かした.

### ・マトリックス溶液

5 mg の CHCA が入った 1.5 mL マイクロチューブに, 70 % アセトニトリル / 0.1 % TFA 水溶液 (7:3) を 1 mL 滴下し, よく攪拌した.

## 2.4 実験方法

### 2.4.1 試料の調製

#### ・鑑別用試料

市販の毛糸を約 150 mg 量り取って 50 mL ビーカーに入れ, はさみで 5 分間切り刻んだ.

#### ・検量線用試料

獣毛を予備凍結 3 min, 粉碎 2 min の条件で凍結粉碎し, 30  $^{\circ}$ C で 4 時間減圧乾燥した. 微粉化した獣毛を, 羊とやぎ, 羊とやくの毛の組み合わせで, 羊毛の重量割合が約 10, 30, 50, 70 及び 90 % で全量が約 100 mg となるように 2 mL マイクロチューブに量り取り, ジルコニアビーズ ( $\phi$  5 mm) を 1 つ入れて, ミキサーミルで 20 Hz, 室温, 3 min の条件で攪拌し, 均質化した.

#### ・模擬試料

市販の毛糸のうち, 羊, やぎ及びやくの毛を原料としたものを予備凍結 3 min, 粉碎 2 min の条件で凍結粉碎し, 30  $^{\circ}$ C で 4 時間減圧乾燥した. 微粉化した獣毛を, ①羊とやぎ, ②羊とやくの毛の組み合わせで, 羊毛の重量割合が約 15, 40, 50, 60 及び 85 % で全量が約 100 mg となるように 2.0 mL マイクロチューブに量り取り, ジルコニアビーズ ( $\phi$  5 mm) を 1 つ入れて, ミキサーミルで 20 Hz, 室温, 3 min の条件で攪拌し, 均質化した.

### 2.4.2 たんぱく質の抽出及びトリプシン処理

調製した試料を Scheme 1 に沿って処理し, ペプチド断片化したものを得た.

#### About 15 mg of chipped or crashed sample in 2 mL micro tube

- Add 500  $\mu$ L of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.8) containing 0.4 % SDS
- Add 10  $\mu$ L of DTT solution and shake
- Heat for 15 min at 95  $^{\circ}$ C
- Centrifuge (6,500  $\times$  g, room temperature, 1 min)
- Add 10  $\mu$ L of DTT solution and shake
- Heat for 15 min at 95  $^{\circ}$ C
- Centrifuge (6,500  $\times$  g, room temperature, 1 min)
- Add 50  $\mu$ L of IAA solution and shake
- Heat at 25  $^{\circ}$ C and rotate at 1,200 rpm for 15 min
- Centrifuge (6,500  $\times$  g, room temperature, 1 min)
- Add 20  $\mu$ L of DTT solution and shake
- Centrifuge (15,000  $\times$  g, room temperature, 5 min)
- Collect 50  $\mu$ L of the supernatant
- Add 200  $\mu$ L of acetone (-20  $^{\circ}$ C)
- Cool for 30 min at -20  $^{\circ}$ C
- Centrifuge (15,000  $\times$  g, room temperature, 5 min)
- Remove the supernatant and add 200  $\mu$ L of acetone
- Cool for 30 min at -20  $^{\circ}$ C
- Centrifuge (15,000  $\times$  g, room temperature, 5 min)
- Remove the supernatant and add 30  $\mu$ L of trypsin solution
- Dry for 30 min at room temperature
- Add 30  $\mu$ L of trypsin solution
- Heat over night at 37  $^{\circ}$ C

#### Peptide fragment solution

Scheme 1 Protein extraction and enzymatic degradation.

### 2.4.3 MALDI-TOF MS による測定

マイクロピペットに ZipTip C18 (Merck Millipore 社) を取り付け, アセトニトリル / 0.1 % TFA 水溶液 (9:1) 及び 0.1 % TFA 水溶液 10  $\mu$ L で 5 回洗浄した. 2.4.2 で得られたペプチド断片溶液を 10  $\mu$ L で 20 回吸排出してペプチド断片を ZipTip C18 に吸着させた後, 0.1 % TFA 水溶液 10  $\mu$ L で 3 回洗浄した. マトリックス溶液 5  $\mu$ L を 3 回, 2.5  $\mu$ L を 5 回吸排出して廃棄した後, 2.5  $\mu$ L を 10 回吸排出して MALDI-TOF MS 用サンプルプレート上に滴下した. その後, 液滴を完全に乾燥させ, MALDI-TOF MS で測定した. 測定は, 累積ショット数 10, プロファイル数 100, Pulsed Extraction 3500 で実施し, レーザー強度は試料に応じ, 動物種特異的ピークの強度が最大になるよう調整した. また, 試料の測定と同時に, 0.1 % TFA 水溶液に溶解させた Peptide calibration standard の測定を

行い、 $m/z$  2093.0862, 2465.1983 及び 3147.4710 の 3 点で MALDI-TOF MS で得られるマススペクトルを校正した。

#### 2.4.4 羊毛の混用率算出

検量線用試料及び模擬試料をそれぞれ 1 検体ずつ 2.4.2 及び 2.4.3 に沿って処理し、1 スポットあたり 5 回任意の箇所測定して動物種特異的ピークの強度の平均値を求め、JIS 法と同様にして羊毛の混用率を算出した<sup>1)</sup>。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 毛糸の原料となった獣毛の鑑別

単一の獣毛 100%を原料とする毛糸の測定結果を Fig. 1 に示す。すべての試料で JIS 法の附属書 B に列挙されている動物種特異的ピークの位置<sup>2)</sup>と一致するピークが認められ、その SN 比も 100 超と良好であった。しかしながら、アルパカとらくだについては、JIS 法と同様に同一の  $m/z$  のピークが得られたため、区別することはできなかった。Fig. 2 に複数種の原料から作られた毛糸の鑑別結果を示す。すべての試料で成分表記と一致する動物種特異的ピークが認められ、ナイロンのような獣毛以外の成分が含まれている試料でも、問題なく分析することが可能であった。

本研究で検証した分析手順には、JIS 法で実施されている電気泳動による精製を省略し、アセトン沈殿のみとすることで、JIS 法と比べて、分析時間が短縮され、使用する試薬量も減少しているため、JIS 法よりも簡易な分析法としての利点がある。少なくとも、今回用いた 6 種類の毛糸については、JIS 法よりも簡易な獣毛の鑑別法として、活用が期待できる。

#### 3.2 羊毛の混用率の算出に関する検証

羊毛の混用率が本研究の簡易分析法で算出可能であるかの検証は、獣毛で調製した検量線用試料の測定結果から検量線を作成し、毛糸で調製した模擬試料中の羊毛の混用率を求め、模擬試料を調製した際の各獣毛の秤量値から算出した羊毛の混用率（以下、調製値と略記する。）と比較することで実施した。獣毛及び毛糸の組

み合わせに関しては、JIS 法で例示されている羊とやぎ、羊とやくの毛の組み合わせとした。検量線を Fig. 3 に示す。羊とやぎの毛の場合、線形近似で決定係数が 0.99 となったが、羊とやくの毛の場合、2 次の多項式近似で決定係数が 0.99 となった。この結果は、JIS 法に例示されている検量線<sup>3)</sup>も同様に、前者は線形近似だが、後者は多項式で近似している。したがって、本研究において検量線を正しく作成することができていると考え、これらの検量線を使用し、模擬試料中の羊毛の混用率を算出した。模擬試料の調製値と、混用率の算出結果を Table 1 に示す。算出値から調製値を差し引くと、最大で 5 %程度の差異が認められたものの、算出値は調製値におおよそ近い値となった。そのため、本研究で検討した簡易分析法でも、例えば、試料中の羊毛の混用率が 60 %程度と算出される場合等で、羊毛が試料中の最も多い獣毛成分であると判定することは可能と思考される。また、JIS 法の附属書 H(参考) ラウンドロビンテスト結果に記載の結果<sup>3)</sup>と矛盾しない程度の誤差であり、本研究結果は、JIS 法で得られる結果と同程度の精度である可能性が考えられる。今後は JIS 法との比較など、より詳細な検討を行う必要がある。

### 4. 要 約

本研究では、JIS 法及び先行研究<sup>3)</sup>を参考に、毛糸の原料の鑑別及び羊毛の混用率を算出するための簡易な分析法の確立を目的とした検討を実施した。毛糸から抽出したたんぱく質の前処理について、電気泳動による精製を省略し、アセトン沈殿による処理のみでも、用意したすべての試料で鑑別が可能であった。また、羊とやぎ、羊とやくの毛を組み合わせた毛糸について、おおよその羊毛の混用率を算出することが可能であった。本研究で考案した分析法は、羊毛とやぎ及びやく以外の組み合わせの試料に対する検証や JIS 法との比較等、更なる検証が必要ではあるが、毛糸の関税分類に資する情報を提供し得る迅速な分析法となることが期待できる。

### 文 献

- 1) JIS L 1030-3-1, 繊維製品の混用率試験方法—第3-1部：獣毛繊維の機器分析—MALDI-TOF MSによる混用率試験 (2023).
- 2) 渡辺惣汰, 家田繭子, 鈴木洋介, 八木潤: 関税中央分析所報, **63**, 55 (2023).
- 3) 株式会社 島津製作所, Application News No.B95 卓上型MALDI-TOF 質量分析計を用いた獣毛の鑑別 (2019).

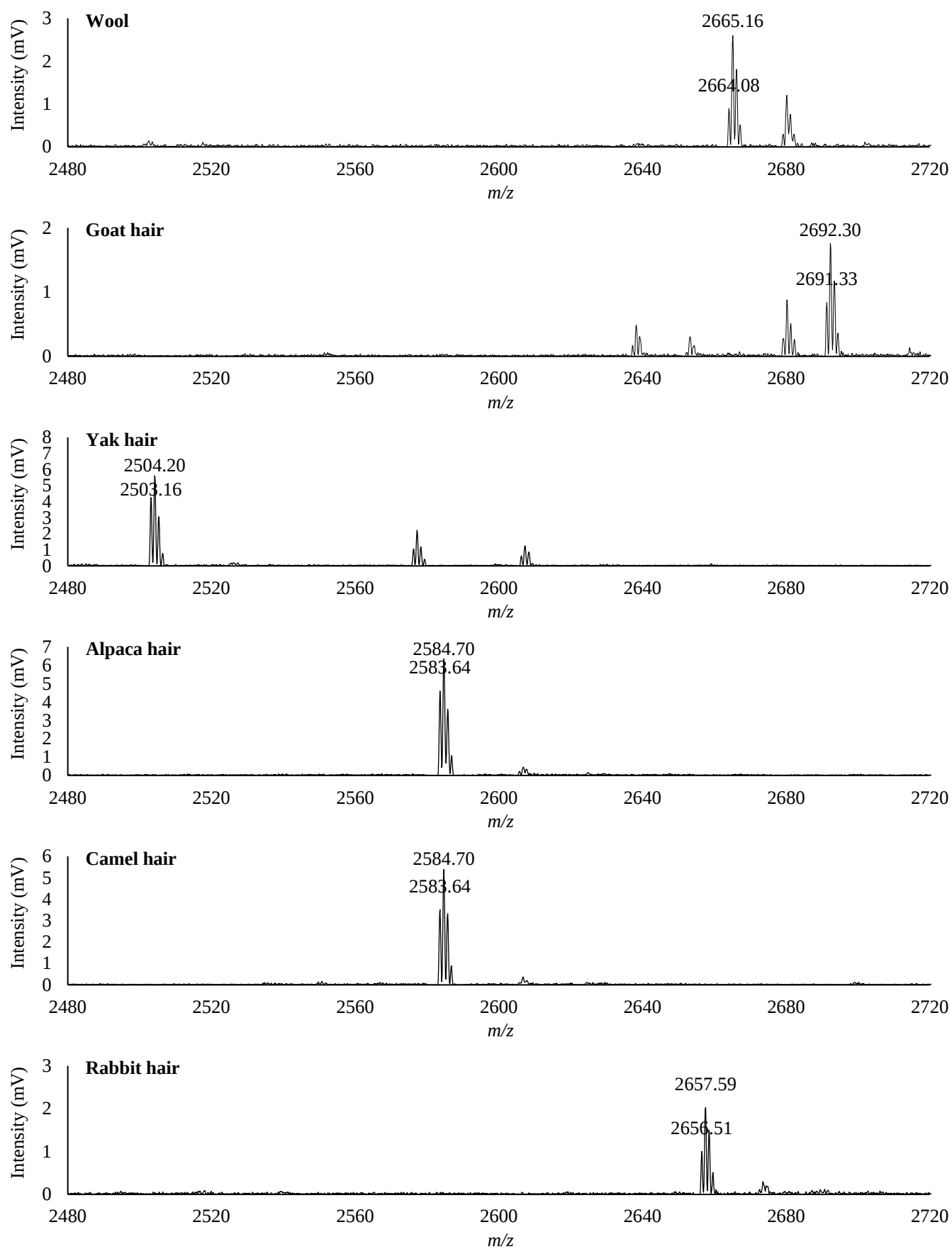


Fig.1 Mass spectra of peptide fragments obtained from yarn (pure ingredient).

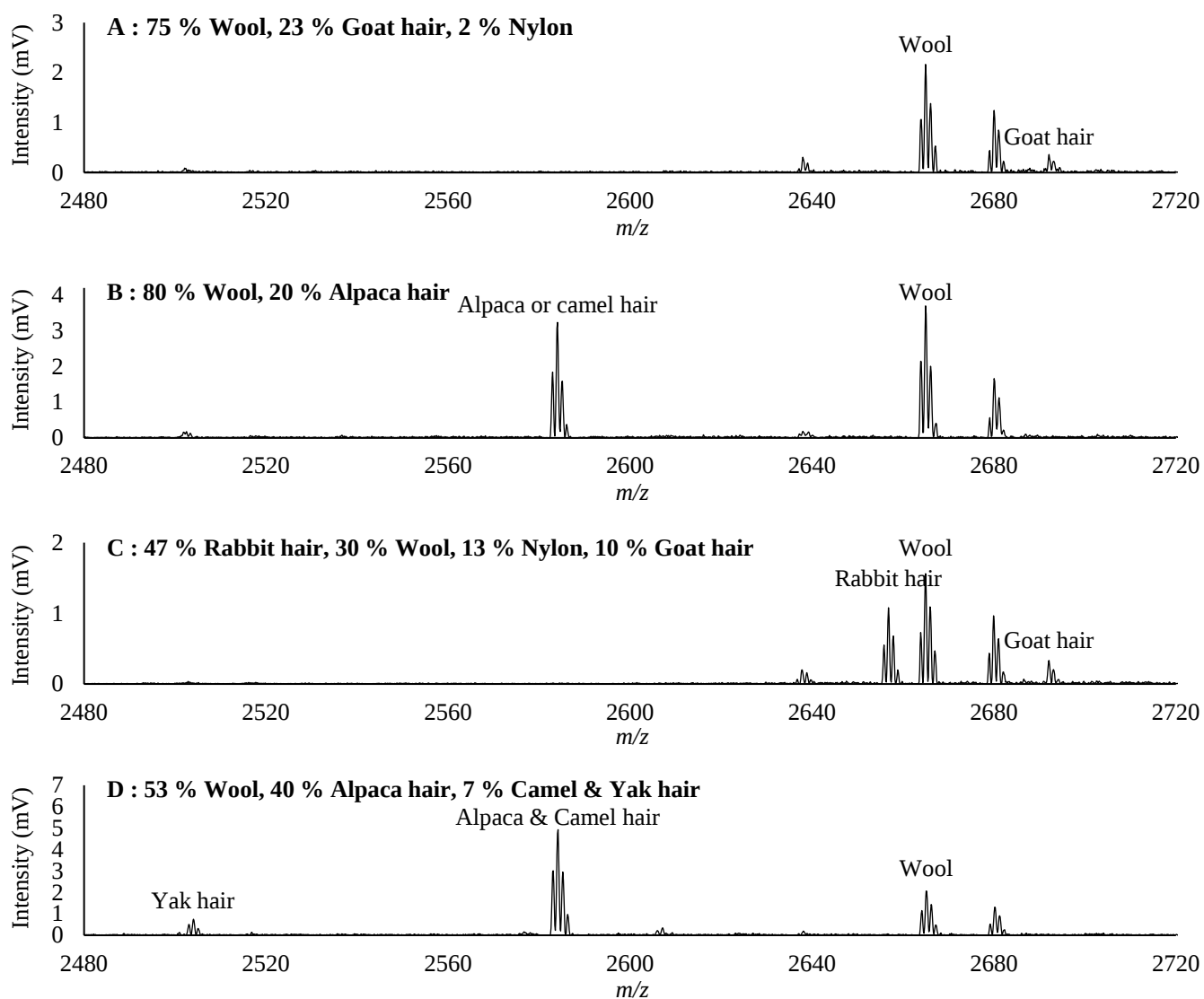


Fig.2 Mass spectra of peptide fragments obtained from yarn (several ingredients).

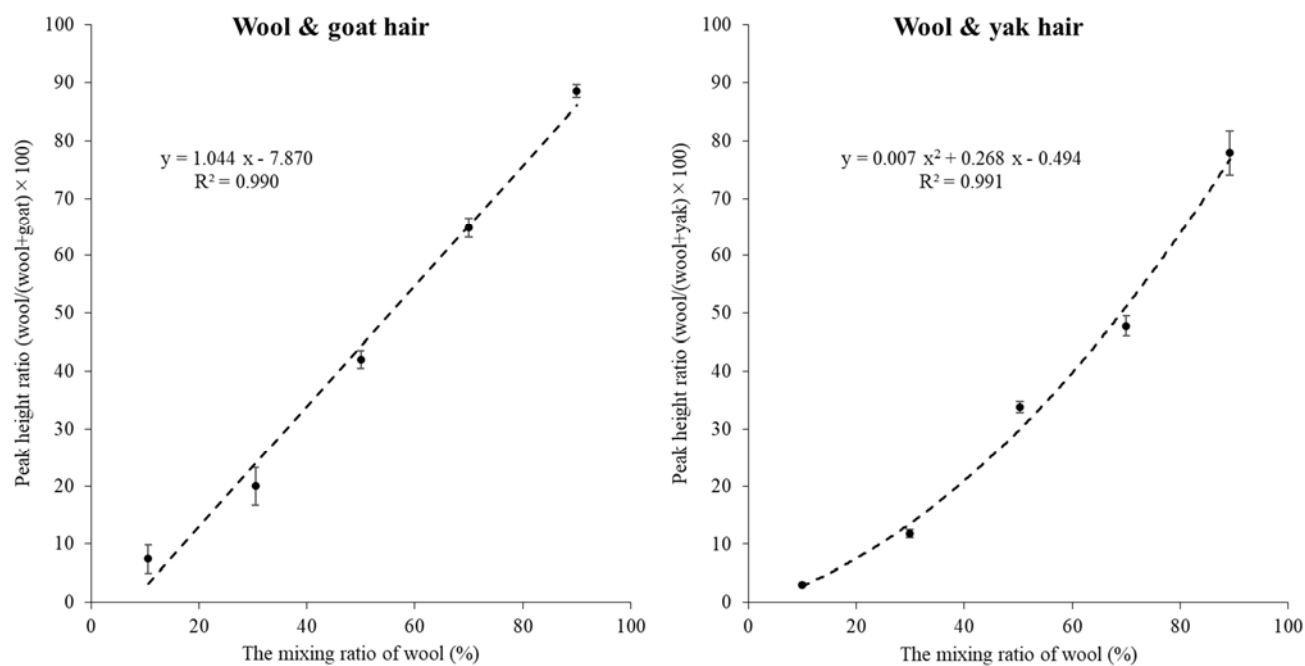


Fig.3 Calibration curve to calculate wool in yarn.

\*Bars of each plot : standard deviation

Table 1 The mixing ratio of wool in simulated sample.

| Ingredient      | The mixing ratio of wool (%) |            | SD   |
|-----------------|------------------------------|------------|------|
|                 | Prepared                     | Calculated |      |
| Wool, goat hair | 14.94                        | 20.55      | 1.63 |
|                 | 39.08                        | 39.72      | 2.28 |
|                 | 50.36                        | 54.86      | 1.11 |
|                 | 59.48                        | 63.50      | 1.00 |
|                 | 85.06                        | 90.58      | 1.47 |
| Wool, yak hair  | 15.22                        | 11.58      | 2.60 |
|                 | 40.41                        | 42.11      | 2.50 |
|                 | 49.84                        | 48.95      | 1.54 |
|                 | 59.72                        | 57.70      | 0.90 |
|                 | 84.73                        | 87.51      | 3.85 |