

LC-MS/MS による食品中メラミンの分析

坂本智徳

福岡市保健環境研究所保健科学課

Determination of Melamine in Foods by LC-MS/MS

Tomonori SAKAMOTO

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

福岡市内を流通する食品 41 検体を対象にメラミンの含有量実態調査を行った。メラミンの通知試験法である LC-MS/MS 法を用いて調製粉乳やビスケット等の回収試験を行ったところ回収率は 10%程度であった。そこで通知法の抽出溶媒量やミニカラムについて検討したところ 90%以上の回収が可能となった。メラミン含有量実態調査の結果、全ての国の指定する定量下限(0.5 mg/kg)未満であったが、41 検体のうち 4 検体から痕跡程度のメラミンを検出した。

Key Words : メラミン Melamine, 高速液体クロマトグラフ / タンデム質量分析装置 LC-MS/MS

1 はじめに

2008 年 9 月、中国国内でメラミンを不正に混入した乳幼児用調製粉乳による乳幼児の腎結石等の被害が報告され、日本を含む諸外国においても中国産の乳または乳製品を使用した食品からメラミンが検出された。

この事件を受け、同年 10 月に厚生労働省から食品中メラミンの試験法として LC-MS/MS 法¹⁾が通知された。通知試験法のとおり測定したところ、調製粉乳やビスケット等の回収試験では回収率は 10%程度であった。そこで抽出および精製法を検討し、福岡市内を流通する食品に対しメラミン含有量実態調査を行ったので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

福岡市内を流通する食品 41 検体

2.2 試薬

メラミン標準品 (98%以上, 和光純薬工業㈱製)

¹⁵N₃ 標識メラミン標準品 (98%以上, 林純薬工業㈱製)
アセトニトリル (残留農薬試験用)

限外ろ過フィルターユニット: MILLIPORE 社製
Amicon Ultra (4 mL, 3K NMWL)を用いた。

エチレンジアミン-N-プロピルシリカゲルミニカラム (PSA): ジーエルサイエンス社製 InertSep PSA(500 mg/6 mL)を用いた。予めメタノール 5 mL および 50%アセトニトリル 5 mL でコンディショニングして使用した。

スルホニルプロピルシリカゲルミニカラム (PRS): ジーエルサイエンス社製 InertSep PRS(500 mg/6 mL)を用いた。予めメタノール 5 mL および 0.1 mol/L 塩酸 5 mL でコンディショニングして使用した。

その他の試薬は特級試薬を用いた。

2.2.1 標準原液

メラミン標準原液 (1000 µg/mL): メラミン標準品 10 mg を 10 mL 容メスフラスコに採り 50%アセトニトリルで溶解し 10 mL とした。

メラミン内標準原液 (1000 µg/mL): ¹⁵N₃ 標識メラミン標準品 10 mg を 10 mL 容メスフラスコに採り 50%アセトニトリルで溶解し 10 mL とした。

2.2.2 標準溶液

メラミン標準溶液 (0.1 µg/mL) : メラミン標準原液を 50%アセトニトリルで 100 倍に希釈し, その溶液 1 mL を 100 mL 容メスフラスコに採り 50%アセトニトリルで 100 mL とした .

メラミン内標準溶液 (0.1 µg/mL) : メラミン内標準原液を 50%アセトニトリルで 100 倍に希釈し, その溶液 1 mL を 100 mL 容メスフラスコに採り 50%アセトニトリルで 100 mL とした .

内部標準法 : 20 mL 容メスフラスコに 0.1 µg/mL メラミン内標準溶液をそれぞれ 4 mL , 0.1 µg/mL メラミン標準溶液を 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mL を採り 50%アセトニトリル溶液を加え 20 mL とした (メラミン 0, 0.0025, 0.005, 0.010, 0.025, 0.050 µg/mL , 内部標準 0.020 µg/mL) .

絶対検量線法 : 20 mL 容メスフラスコに 0.1 µg/mL メラミン標準溶液を 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mL を採り 50%アセトニトリル溶液を加え 20 mL とした (0, 0.0025, 0.005, 0.010, 0.025 µg/mL) .

なお ,通知によって指定された定量限界値(0.5 mg/kg) は 0.005 µg/mL 標準溶液が相当する .

2.3 装置

高速液体クロマトグラフ : Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズを使用した .

タンデム質量分析装置 : Applied Biosystems 社製 API2000 を使用した .

2.4 測定条件

LC-MS/MS 条件を表 1 に示した .

2.5 抽出方法

試料約 5 g を精密に量り, 50%アセトニトリル 15 mL を加えホモジナイズした . 試料を 3000 rpm , 15 min 遠心分離し上清を分取した . これを 3 回繰返し, 上清を合わせ 50%アセトニトリルで 50 mL に定容し限外ろ過した .

限外ろ過した溶液を 0.5 mL 分取し ,50%アセトニトリル 4.5 mL と混合しエチレンジアミン-N-プロピルシリカゲルミニカラムに負荷した . 50%アセトニトリル 1 mL で洗浄し, 通過液と洗浄液をあわせ 1 mol/L 塩酸 130 µL を加え塩酸性としたのちスルホニルプロピルシリカゲルミニカラムに全量負荷した .

カラムを 0.1 mol/L 塩酸 2 mL およびメタノール 1 mL で洗浄したのち ,5%アンモニア-メタノール 5 mL で溶出した 溶出液をロータリーエバポレーターで減圧乾固し, 残渣に 50%アセトニトリル 5 mL を加え 5 分間超音波処理した液を 0.20 µm メンブランフィルターでろ過し

LC-MS/MS で測定した .

表 1 LC-MS/MS 条件

Column	SeQuant ZIC-HILIC 150 × 2 mm i.d. , 3.5 µm
Column temp.	25
Mobile phase	A: 10 mmol/L Ammonium acetate B: Acetonitrile
Gradient profile	Time(min) 6 6.01 20 B(%) 85 40 40
Post time	15 min
Injection volume	5 µL
Ionization	ESI(+)
Ionspray voltage	5 kV
Turbo gas temp.	500
Dwell time	200 msec
Declustering potential(DP)	51 V
Collision energy(CE)	11 eV
Precursor ion	m/z 127 , 130(I.S.)
Product ion 1	m/z 85 , 87(I.S.)
Product ion 2	m/z 43 , 44(I.S.)

3 結果および考察

3.1 抽出法の検討

通知試験法では, 試料 5 g に対し 50%アセトニトリルを 25 mL 加えるとされている . しかし, 調製粉乳等の塩を多く含む試料を分析したところ水層とアセトニトリル層の分離が起きた . また, 遠心分離した上清を直接ミニカラムに負荷するとミニカラムが詰まる試料が多かった . そこで抽出液量を 2 倍に増やし, 限外ろ過および希釈を行った試料を負荷するよう変更した . その結果, 水層とアセトニトリル層の分離は起こらず, ミニカラムの通液性も良好となった .

3.2 ミニカラムの検討

3.2.1 エチレンジアミン N-プロピルシリカゲルミニカラム

Bond Elut PSA および InertSep PSA を検討した . クリーンアップ効果には大きな差は見られなかったため, より通液性に優れた InertSep PSA を採用した .

3.2.2 強酸性陽イオン交換ミニカラム

使用するカラムの例として, 通知試験法では Bond Elut SCX が, FDA 法²⁾ではポリマーベースの Oasis MCX が挙げられている . そこで, シリカゲルベースまたはポリ

マーベースの強酸性陽イオン交換カラムである Bond Elut SCX ,InertSep SCX ,InertSep PRS ,Oasis MCX ,InertSep MPC および InertSep MC-1 についてクリーンアップ効果を検討した .InertSep MC-1 は保持が弱く標準液でも保持しなかった .InertSep SCX はロット間にばらつきが見られ保持しないものがあった . Bond Elut SCX , InertSep PRS , Oasis MCX , および InertSep MPC は良好に保持したが ,その中で通液性に優れるものは InertSep PRS ,Oasis MCX および InertSep MPC であった .そこで ,イオン交換容量が大きく入手が容易な InertSep PRS を採用した .

以上の結果から ,クリーンアップには InertSep PSA および InertSep PRS を用いて以下の実験を行った .

3.3 添加回収試験

調製粉乳 ,チョコレートおよびビスケットについて添加回収試験(n=3)を行った結果を表 2 に示す .定量法について絶対検量線法と内部標準法を比較したところ ,絶対検量線法で回収率が高くなる傾向が見られた .内部標準物質のピーク面積も増加していたため ,イオン化促進物質の影響と考えられる .また ,相対標準偏差は 10%未満と良好であった .実態調査には ,イオン化促進または阻害物質の影響を補正できる内部標準法を採用した .

3.4 実態調査

福岡市内を流通する食品計 41 検体について含有量実態調査を行った結果を表 3 に示す .41 検体のうち 4 検体でメラミンを定性的に検出したが ,定量下限を超えてメラミンを検出した食品はなかった .

表 2 添加回収試験の結果(n=3)

定量法	分類	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
A.C.	調製粉乳	131	8.6
	チョコレート	97	5.2
	ビスケット	115	7.2
I.S.	調製粉乳	106	3.4
	チョコレート	109	7.0
	ビスケット	113	1.4

A.C.: 絶対検量線法 , I.S.: 内部標準法

4 まとめ

通知試験法に改良を加え ,福岡市内流通食品のメラミン含有量実態調査を行った .検討の結果 ,調製粉乳 ,チョコレートおよびビスケットで良好な回収率が得られ ,相対標準偏差も 10%未満と良好であった .41 検体のうち 4 検体から痕跡量のメラミンを検出したが ,定量下限を超えてメラミンを検出した食品はなかった .

文献

- 1) 厚生労働省通知食安監発第 1002002 号 : 食品中のメラミンの試験法について , 平成 20 年 10 月 2 日
- 2) FDA: Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues in Infant Formula using LC-MS/MS , Laboratory Information Bulletin LIB No. 4421 Volume 24, October 2008.

表 3 福岡市内流通食品のメラミン測定結果

食品分類	メラミン (mg/kg)	食品分類	メラミン (mg/kg)	食品分類	メラミン (mg/kg)	食品分類	メラミン (mg/kg)
調製粉乳	n.d.	クラッカー	tr.	ビスケット	n.d.	キャンディー	n.d.
調製粉乳	n.d.	チョコレート	n.d.	クッキー	n.d.	キャンディー	n.d.
調製粉乳	n.d.	チョコレート	n.d.	ウエハース	n.d.	キャラメル	n.d.
クラッカー	n.d.	チョコレート	n.d.	ウエハース	n.d.	マシュマロ	n.d.
クラッカー	n.d.	チョコレート	n.d.	プレッツェル	n.d.	チーズ	n.d.
クラッカー	n.d.	チョコレート	n.d.	プレッツェル	n.d.	ヨーグルト	n.d.
クラッカー	n.d.	チョコレート	n.d.	トルティーヤ	n.d.	キムチ	n.d.
クラッカー	n.d.	チョコレート	tr.	トルティーヤ	n.d.	八チミツ	n.d.
クラッカー	n.d.	チョコレート	tr.	クリスマス	n.d.		
クラッカー	n.d.	ビスケット	n.d.	今川焼き	n.d.		
クラッカー	tr.	ビスケット	n.d.	たこやき	n.d.		

n.d.: 不検出 tr.: 痕跡