

メラミン分析法の検討

常政 典貴 河瀬 志保* 佐々木 珠生 末田 義博

はじめに

2008年9月に中国で特定の粉ミルクを飲んだ乳幼児が腎臓結石等の腎疾患を発症している事が明らかとなった。調査の結果、大規模な健康被害の原因は、本来食品に添加されることの無いメラミンが粉ミルクの原料である牛乳に添加されたことによるものと判明した。日本国内においても、中国から輸入された乳製品やこれらを原材料とする加工食品からメラミンが検出され、厚生労働省が、これらの食品について検査命令を通知する事態となった。

当所においても、厚生労働省から出された分析法¹⁾にもとづき、市販品の分析検査を行った。しかしながら、この分析法で行った場合、分析の条件とされている内部標準物質の回収率などが、条件に合わないことがあった。そこで今回、厚生労働省から出された分析法の修正や分析機器メーカーの提案した分析法²⁾により、分析法を検討したので報告する。

方法

1 試料

グラタンソース、ウエハースA・B、チョコレート菓子を試料とした。

2 試薬

標準品：メラミンは関東化学(株)製を使用し、内部標準物質メラミン-¹³C₃・¹⁵N₃はCambridge Isotope Laboratories, Inc. 製を使用した。

標準液：各標準品を50%アセトニトリル水溶液に溶解し、10μg/mlの濃度に調製した。

その他の試薬：高速液体クロマトグラフ用、残留農薬試験用または特級品を使用した。

3 装置

高速液体クロマトグラフ：島津製 Prominenc 質量分析装置：Applied Biosystems 社製 API4000

4 測定条件

(1) HPLC 条件

カラム：XBridge HILIC(内径 2.1mm, 長さ 100mm, 粒子径 3.5μm) (Waters 製)

移動相：A液；5mmol 酢酸アンモニウム

B液；アセトニトリル

グラジエント条件

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
0	0	100
4	15	85
5	60	40

流速：0.2ml/min

カラム温度：40℃

注入量：5μl

(2) MS/MS 条件

イオン化モード：ESI(+)

質量分析計パラメーター

測定化合物	モーターイオン	DP (V)	CE (V)
メラミン	定性	68.1	41.0
	定量	85.2	27.0
メラミン 内標準	定性	71.1	45.0
	定量	89.2	27.0

DP : Decluster Potential

CE : Collision energy

5 前処理法の検討 (添加回収試験)

(1) 厚労省通知の方法

均一化した試料 5.0g を量り取り、メラミン内標準品の 50%アセトニトリル溶液(10μg/ml)0.5ml, メラミンの 50%アセトニトリル溶液(10μg/ml)0.5ml 及び 50%アセトニトリル水溶液 25ml を加え、ホモジナイズ後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上清を抽出液とした。

VARIAN Bond Elut PSA 500mg にメタノール 5ml, 50%アセトニトリル水溶液 5ml を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに前操作で得られた抽出液 5ml を注入した後、50%アセトニトリル水溶液 1ml を注入した。全溶出液を合わせ、1mol/l 塩酸 130μl を加えた。

VARIAN Bond Elut SCX 500mg にメタノール 5ml, 水 5ml を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに前操作で得られた溶出液を注入した後、0.1mol/l 塩酸 2ml, メタノール 1ml を順次注入し、流出液は捨てた。次いで 5%アンモニアメタノール溶液 5ml を注入した。溶出液を減圧乾固した

* : 現 健康福祉局保健部環境衛生課

残留物に 50%アセトニトリル水溶液 10ml を加え、5 分間超音波処理した。得られた溶液 1ml を取り、50%アセトニトリル水溶液 1ml を加え、0.2 μmPTFE フィルターでろ過した。得られたろ液を試験溶液とした。

(2) 厚労省通知の修正法

厚労省通知の方法のうち、50%アセトニトリル水溶液を 60%アセトニトリル水溶液に変更した。

(3) 分析機器メーカー推奨法の変法

分析機器メーカー推奨の方法は以下のとおり。

均一化した試料 5.0g を量り取り、メラミン内標準品の 50%アセトニトリル溶液 (10 μg/ml) 0.5ml メラミンの 50%アセトニトリル溶液 (10 μg/ml) 0.5ml 及び 1%トリクロロ酢酸水溶液 25ml を加え、ホモジナイズ後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上清を抽出液とした。

InertSep SCX 500mg 又は InertSep PRS 500mg にメタノール 10ml、水 10ml を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに前操作で得られた抽出液 5ml を注入した後、水 10ml、メタノール 10ml を順次注入し、流出液は捨てた。次いで 5%アンモニアメタノール溶液 5ml を注入した。溶出液を減圧乾固した残留物に 50%アセトニトリル水溶液を加え 2ml に定容とした。

最後の部分を以下のように変更した。

50%アセトニトリル水溶液 10ml を加え、5 分間超音波処理した。得られた溶液 1ml を取り、50%アセトニトリル水溶液 1ml を加え、0.2 μmPTFE フィルターでろ過した。得られたろ液を試験溶液とした。

結 果

1 厚労省通知の方法と修正法の比較

グラタンソースにメラミン標準品とメラミン内標準品を添加して、回収率の比較を行った。結果を表 1 に示す。

厚労省通知の方法では、分析に必要な 2 つの要件 A と B に適合しない場合があったが、抽出溶媒などを変更することによって、要件を満たすことが出来た。不適合部分

以下の分析結果は n=1 なので、参考値とする。

2 分析困難品の回収率比較

分析の困難なウエハース 2 品とチョコレート菓子にメラミン標準品とメラミン内標準品を添加して、回収率の比較を行った。

修正法によるチョコレート菓子の分析では、要件を満たすことが出来たが、その他の分析では A

表 1 厚労省通知の方法と修正法の比較 (n=5)

	厚労省の通知方法			修正法		
	A	B	判定	A	B	判定
1	59.8	66.9	×	58.1	74.2	○
2	53.3	72.6	○	58.4	76.1	○
3	53.7	70.6	○	59.1	74.0	○
4	59.8	67.1	×	62.7	71.2	○
5	64.9	69.8	×	63.1	74.9	○
平均	58.3	69.4	×	60.3	74.1	○
平均	58.3	69.4	×	60.3	74.1	○

A : 内部標準回収率 40%以上

B : 内標準で補正したメラミン回収率 70~120%

表 2 分析困難品の回収率比較

	厚労省の通知方法			修正法		
	A	B	判定	A	B	判定
1	53.8	58.4	×	37.0	60.4	×
2	76.4	66.4	×	71.8	64.4	×
3	70.8	66.0	×	44.8	73.0	○

A : 内部標準回収率 40%以上

B : 内標準で補正したメラミン回収率 70~120%

1 : ウエハース A

2 : ウエハース B

3 : チョコレート菓子

表 3 分析器具メーカー推奨法の変法による分析

	InertSep PRS			InertSep SCX		
	A	B	判定	A	B	判定
1	95.7	69.2	×	73.5	75.2	○
2	73.5	61.9	×	60.7	66.8	×
3	95.3	68.9	×	72.2	76.1	○
4	91.6	80.5	○	86.4	78.8	○

A : 内部標準回収率 40%以上

B : 内標準で補正したメラミン回収率 70~120%

1 : ウエハース A

2 : ウエハース B

3 : チョコレート菓子

4 : グラタンソース

と B 2 つの要件を満たすことが出来なかった。結果を表 2 に示す。不適合部分

3 分析器具メーカー推奨法の変法による分析

分析困難品の分析においては、修正法によるチョコレート菓子の分析のみが 2 つの要件に適合であったので、さらに分析器具メーカー推奨法の変法による分析を行った。

InertSep PRS では、分析に必要な 2 つの要件 A と B に適合した品目はグラタンソースのみであっ

た。InertSep SCX では、ウエハースB 以外は分析に必要な2つの要件AとBに適合した。結果を表3に示す。不適合部分

ま と め

1. 厚労省通知の方法では、分析に必要な2つの要件AとBに適合しない場合があったが、抽出溶媒などを変更した修正法で行うことによって、比較的 analysis の容易な品目については、要件を満たすことが出来た。
2. クリームなど乳脂肪分を多く含む、分析困難

品目の分析では、分析機器メーカー推奨の変法を用いたが、分析要件を十分に満たしているとは言えない結果であり、さらなる検討が必要である。

文 献

- 1) 平成20年10月2日付け, 食安監発第1002002号, 食品中のメラミンの試験法について
- 2) 陳 杏玲 他: 焼き菓子中のメラミン測定法の検討, 第97回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集, P27 (2009)