

食品中のメラミンの定量法の検討

宮川 弘之^a, 安井 明子^a, 貞升 友紀^a, 荻本 真美^a, 羽石 奈穂子^a, 小林 千種^a, 植松 洋子^a

2008年に中国において、メラミンが混入した乳児用粉ミルクを摂取することにより、多数の乳児に死亡を含む健康被害を生じた。2010年にも中国においてメラミン入りの乳飲料が押収されるなど、この問題はまだ終わりを見せていない。このような状況下、当センターにおいてもメラミンの試験法を整備しておくことが必要である。そこで我々は、試料抽出液を固相抽出により精製した後、LC/MS/MSにより測定する方法を用いて食品中のメラミンの分析法を作成し、厚生労働省通知のメラミン試験法の性能基準を指標として妥当性評価を行った。すなわち、厚生労働省通知の分析例に、抽出溶媒量を増やす、試料の種類により水を用いて抽出するなどの変更を加え、さらにその細部を決定することにより分析法を作成した。作成した分析法を日常検査に導入するために、10種類の食品に2濃度のメラミンを添加し、3名の試験者が異なる実験室で5日間分析を行うことにより妥当性評価試験を行い、室内精度、室間精度についても検討した。その結果、おおむね妥当な結果が得られた。

キーワード: メラミン, 分析法, 定量法, 妥当性評価, 食品, LC/MS/MS

はじめに

2008年(平成20年)に中国において、多数の乳児がメラミンに汚染された乳児用粉ミルクを摂取したことにより、死亡を含め数多くの健康被害を生じた。この事件は、メラミンが故意に添加された原料乳から製造された乳児用粉ミルクを、乳児が摂取したことにより腎臓に傷害が起こったものであるが、その後、わが国をはじめ多くの国において各種加工食品からメラミンが検出され、大きな問題となった。2010年にも中国においてメラミン入りの乳飲料が押収されるなど¹⁾、この問題はいまだに終わりを見せていない。

このような状況下、当センターにおいても食品中のメラミンの分析法を整備しておく必要がある。

食品中のメラミンの分析法としては、平成20年に厚生労働省の通知²⁾において試験法の例が示されたが、この例においては操作法について詳細に記載されておらず、また、試料によっては満足な回収率が得られないものもあった。

そこで今回われわれは、厚生労働省通知の試験法例を基に分析法を作成し、その分析法について妥当性評価試験を行った。

実験方法

1. 試料

以下に示す市販の食品。なお、妥当性評価に用いた試料は、それぞれの食品につき同じ銘柄でロットが異なるものを3検体ずつ購入し、試験者毎に異なるロットのものを用いた。

(1)乳児用粉ミルク, (2)コーヒー用ミルクパウダー, (3)プロセスチーズ, (4)ヨーグルト, (5)チョコレート, (6)ミルクキャンディー, (7)マヨネーズ, (8)菓子パン, (9)ビスケット, (10)肉まん

2. 試薬

メラミンおよびメラミン₁₅N₃は林純薬工業(株)製のものを用いた。アンモニア水(25~28%), 塩酸(35~37%), 酢酸アンモニウムは試薬特級を使用し、アセトニトリル、メタノールは高速液体クロマトグラフィー用を用いた。水は超純水(比抵抗値>18 MΩ・cm)を使用した。

メラミン標準原液: メラミン10 mgを正確に量り採り、アセトニトリル・水(1:1)に溶解し100 mLとした(100 μg/mL)。

メラミン検量線用標準液: メラミン標準原液をアセトニトリル:水(9:1)を用いて適宜希釈し、0.005~0.5 μg/mLとした。

メラミン内標準原液: メラミン₁₅N₃ 5 mgを正確に量り採り、アセトニトリル・水(1:1)に溶解し25 mLとした(200 μg/mL)。

メラミン内標準液: メラミン内標準原液をアセトニトリル:水(9:1)を用いて適宜希釈し、5 μg/mLおよび10 μg/mLとした。

アンモニア・メタノール溶液: アンモニア水とメタノールを1:19の比率で混合した。

1 mol/L塩酸: 塩酸8.8 mLに水を加えて100 mLとした。

0.1 mol/L塩酸: 1 mol/L塩酸を水で10倍希釈した。

エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム: Bond Elut PSA (500 mg) (Agilent社製); 使用前にメタノール, アセトニトリル・水(1:1)各5 mLでコンディショニングを行った。ただし、ミルクキャンディーを分析する場合は、使用前にメタノール, 水各5 mLでコンディショニングを行った。

強酸性陽イオン交換体ミニカラム: Bond Elut SCX (500 mg) (Agilent社製); 使用前にメタノール, 水各5 mLでコ

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科

ンデISHヨニングを行った。

0.2 μmフィルター：Millex LG（直径13 mm）

（MILLIPORE社製）

0.45 μmフィルター：Millex LH（直径13 mm）

（MILLIPORE社製）

3. 装置および測定条件

1) 装置

LC/MS/MS装置は、Waters社製Quattro Premier XEおよびApplied Biosystems社製API4000 Q TRAPを用いた。

2) LC/MS/MS測定条件

カラム：Cosmosil HILIC（内径2.0 mm，長さ150 mm，粒子径5 μm）（ナカライテスク（株）社製），カラム温度：40°C，注入量：5 μL，移動相：アセトニトリル・0.02 mol/L酢酸アンモニウム溶液（90：10），流速：0.2 mL/min，イオン化モード：ESI（+），分析モード：MRM，ターゲットイオン： m/z 127→85（定量用） m/z 127→68（確認用） m/z 130→87（内標準定量用） m/z 130→69（内標準確認用），その他の質量分析計パラメーターは装置ごとに最適化した設定を行った。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出および精製

試験溶液の調製法を図1に示した。

試料 5.0 g	メラミン ₁₅ N ₃ 5 μg
	* アセトニトリル・水（1：1） 70～80 mL
	ホモジナイズ（1分間）
	* アセトニトリル・水（1：1）で100 mLに定容
	遠心分離（3,000 rpm，10分間）
上清	ろ紙（5A）でろ過
ろ液 5 mL	** Bond Elut PSA（500 mg）に負荷
	* アセトニトリル・水（1：1）1 mLを注入
全溶出液	1 mol/L塩酸 130 μL
	***Bond Elut SCX（500 mg）に負荷
	0.1 mol/L塩酸 2 mL，メタノール 1 mLで洗浄
	アンモニア・メタノール溶液 5 mLで溶出
溶出液	減圧乾固
残留物	アセトニトリル・水（9：1） 2.5 mL
	超音波処理 5分間
	アセトニトリル・水（9：1）で5 mLに定容
	フィルターろ過
試験溶液	
	* 試料がミルクキャンディーの場合は水を用いる。
	** 前処理：メタノール5mL，*アセトニトリル・水（1：1）5 mL
	***前処理：メタノール5 mL，水5 mL

図1. 試験溶液の調製方法

2) 検量線用標準溶液の調整

メラミン標準原液をアセトニトリル：水（9：1）を用いて適宜希釈し，0.005～0.5 μg/mLとした。各濃度の溶液10

mLにメラミン内標準液（5 μg/mL）を100 μL加え混合したものを検量線用標準溶液とした。

3) 検量線

検量線用標準溶液をLC/MS/MSにより測定し，メラミン（ m/z 127→85）/メラミン内標準（ m/z 130→87）のピーク面積比を用いて検量線を作成した。

5. 妥当性評価

1. 試料に示した10種類の試料を用いて分析法の妥当性評価を行った。妥当性を評価するためのメラミンの添加濃度は，0.5 mg/kg（定量限界濃度）および5.0 mg/kg（定量限界濃度の10倍）とした。定量限界濃度は，厚生労働省通知に記載の濃度とした。試験は3名の試験者（試験者1～3）が別々の実験室において異なるロットの試料を用い同様の操作を行った。すなわち，各試験者が1日に，試料1種類につき2濃度の添加量の添加試料をそれぞれ2併行，合計4回分析し，この分析を5日間実施した。なお，各試験者が各種試料の分析を実施する際に，無添加の該当試料を2併行1回分析した。

結果及び考察

1. 分析条件の検討

厚生労働省通知において示された試験法例では，試料5.0 gに50%アセトニトリルを25 mL加え，ホモジナイズおよび遠心分離した後，上清を固相抽出に供している。しかし，この方法では乳児用粉ミルク等粉末の試料において溶媒量が不足し，上清中に混入した試料成分により固相抽出カートリッジが目詰まりして分析が困難になることがあった。そこで本法では，試料5.0 gにアセトニトリル・水（1：1）を加えてホモジナイズした後100 mLに定容することにした。このように定容することにより計算も容易になった。

また，ミルクキャンディー等極性の大きな糖類が主原料である試料では，厚生労働省通知の試験法例を用いると，1 mg/kg添加した場合で回収率が22～23%となり満足な結果を得ることができなかった。試験法例では抽出溶媒およびエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出溶媒として50%アセトニトリルを用いているが，この溶媒に糖類を主原料とする試料が溶解しにくいためであることが考えられた。そこでミルクキャンディーの分析において，これらの溶媒として50%アセトニトリルの代わりに水を用いたところ良好な結果が得られた。本法ではミルクキャンディーの分析においてはこれらの溶媒として水を用いることにした。

試験法例のHPLC条件ではグラジエント溶離法を用いているが，本法ではより簡便なアイソクラティック溶離法を用いることにした。それに伴い，試料溶液の溶媒としてアセトニトリル・水（9：1）を用いることにした。ヨーグルトの m/z 127→85におけるMRMクロマトグラムを図2に示した。

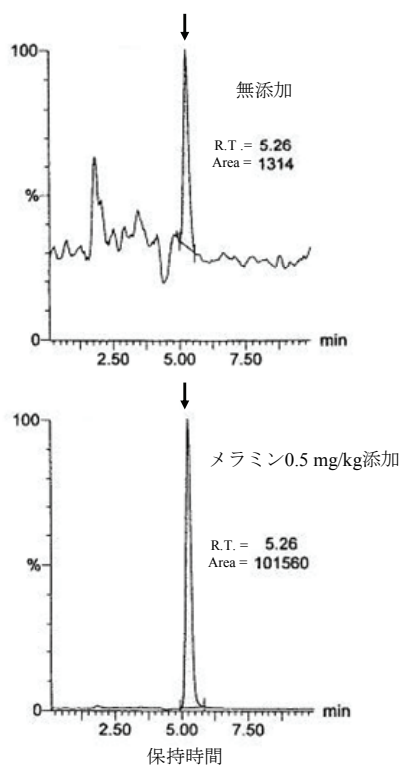


図2. ヨーグルトのMRMクロマトグラム
(m/z 127→85)

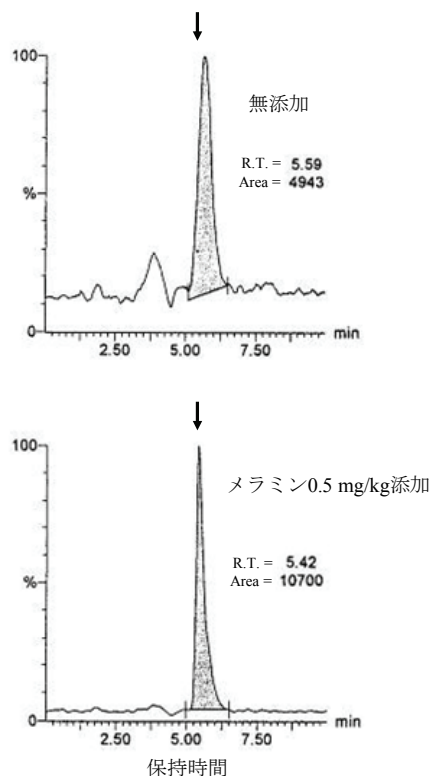


図3. 妨害ピークが観察された幼児用粉ミルクの
MRMクロマトグラム (m/z 127→85)

2. 分析法の妥当性評価

本法の妥当性を評価するため、実験方法5に示したとおり添加回収試験を行った。

測定値を解析し、推定された真度（回収率）、併行精度、室内精度、室間精度を表1に示した。今回は各試験者が異なるロットの添加用試料を用いたため、室間精度は参考値である。

厚生労働省通知のメラミン試験法の性能基準のうち選択性について、ブランク試料に妨害ピークを認める場合は、定量限界濃度に相当する披検査物質のピークの面積（又は高さ）の1/3未満であることとされている。今回のほとんどの無添加試料の分析において、メラミンに対する妨害ピークは定量限界濃度に相当するメラミンのピーク高さの1/3未満であった。しかし、試験者3の乳児用粉ミルクおよびプロセスチーズの分析において定量限界濃度相当の1/3以上の高さの妨害ピークが無添加試料に観察された。この原因としては、添加用試料のロットの違いが考えられ、これらのものは評価の対象から除いた。妨害ピークが観察された幼児用粉ミルクおよびチーズの m/z 127→85におけるMRMクロマトグラムを図3、図4に示した。

厚生労働省通知のメラミン試験法の性能基準では、分析対象食品に定量限界濃度又はその2倍の濃度のメラミンを添加して回収試験を行った場合、回収率は70～120%、内標準の回収率は40%以上、併行精度は5回以上試行で10%未満とされている。今回の調査で定量限界濃度である0.5 mg/kgとなるように各試料にメラミンを添加し分析したと

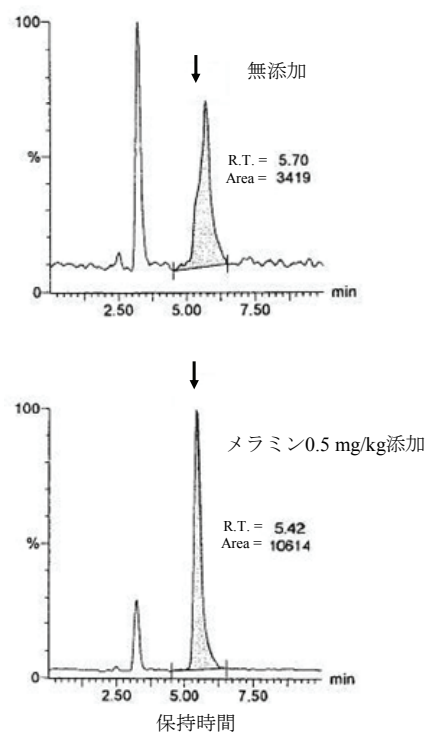


図4. 妨害ピークが観察されたチーズの
MRMクロマトグラム (m/z 127→85)

表1. 各種試料における真度, 併行精度, 室内精度および室間精度*

試料	メラミン 添加濃度 (mg/kg)	試験者	真度 (回収率) (平均値 %)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	室間精度* (%)
乳児用粉ミルク	0.5	1	103.0	2.6	4.2	—
		2	102.1	1.0	4.1	
		3	—	—	—	
	5.0	1	100.4	2.7	3.8	—
		2	99.8	1.1	1.2	
		3	—	—	—	
コーヒー用ミルクパウダー	0.5	1	96.5	1.2	9.7	7.6
		2	101.3	1.3	2.5	
		3	104.7	4.2	7.2	
	5.0	1	97.6	0.9	1.9	2.8
		2	98.4	1.2	2.6	
		3	101.2	0.5	2.0	
プロセスチーズ	0.5	1	104.4	4.6	17.3	—
		2	101.9	2.1	3.0	
		3	—	—	—	
	5.0	1	94.9	1.5	9.8	—
		2	99.3	1.2	1.8	
		3	—	—	—	
ヨーグルト	0.5	1	92.1	1.1	13.8	8.7
		2	99.0	1.1	4.0	
		3	100.0	2.5	4.1	
	5.0	1	97.4	0.7	1.9	2.0
		2	98.0	1.8	1.8	
		3	100.0	0.6	1.7	
チョコレート	0.5	1	113.2	1.2	5.0	—
		2	111.4	2.9	9.3	
		3	125.2	—	—	
	5.0	1	101.4	2.1	2.1	2.6
		2	100.2	1.5	2.3	
		3	103.4	2.4	2.5	
ミルクキャンディー	0.5	1	97.7	1.9	16.2	9.1
		2	101.1	1.7	2.6	
		3	103.2	3.5	4.5	
	5.0	1	105.1	1.4	11.8	7.3
		2	98.4	1.5	1.7	
		3	99.4	1.5	1.5	
マヨネーズ	0.5	1	97.2	1.7	9.9	5.8
		2	98.4	1.1	2.5	
		3	99.0	3.0	3.0	
	5.0	1	96.8	1.3	2.2	2.0
		2	97.9	1.6	2.1	
		3	98.7	1.7	1.7	
菓子パン	0.5	1	112.8	1.4	16.7	11.1
		2	102.9	2.0	2.3	
		3	100.9	2.1	3.4	
	5.0	1	107.7	1.5	11.9	8.2
		2	98.4	1.6	1.9	
		3	99.9	1.8	1.8	
ビスケット	0.5	1	100.7	1.2	7.9	5.4
		2	102.4	1.7	2.7	
		3	105.1	3.5	4.8	
	5.0	1	99.4	0.6	1.9	2.5
		2	97.8	1.5	1.9	
		3	100.0	3.2	3.2	
肉まん	0.5	1	104.3	1.6	11.5	—
		2	101.8	2.8	3.3	
		3	120.5	—	—	
	5.0	1	99.9	1.6	2.7	4.6
		2	98.1	1.2	1.6	
		3	105.0	3.4	4.3	

各試験者が別ロットの添加用試料にメラミンを添加し, 1日2回, 5日間分析した。

*室間精度は参考値

—: 評価せず

ころ、試験者3のチョコレートおよび肉まんの分析において回収率が120%よりも大きくなった。当試験者が行ったチョコレートのブランク試料の分析において、定量可能な大きさよりも小さいがメラミンに対する妨害ピークが観察され、また、当試験者が行った肉まんのブランク試料の分析において、定量可能な大きさよりも小さいがメラミンと思われるピークが観察された。回収率が120%を超えたのはこれらの理由によると考えられ、この2件については、並行精度等は算出しなかった。

他の分析の0.5 mg/kg添加時の併行精度は1.0~8.1%であり、また、表には示していないが、内標準であるメラミン $^{15}\text{N}_3$ の回収率は43.2~121.0%とすべて40%以上であった。これらの結果は厚生労働省通知の性能基準を満たしていた。

厚生労働省通知のメラミン試験法の性能基準では、定量限界は0.5 mg/kgとされている。定量限界の条件をS/N=10以上とすると、評価の対象とした分析のすべてにおいて0.5 mg/kg添加時のS/Nが10以上であった。

このように今回3名の試験者が異なる実験室で別ロットの添加用試料を用いて同様な手法で妥当性評価試験を行ったが、おおむね妥当な結果が得られた。

室内精度については、一部の試料において15%以上のものが見られたがおおむね良好であった。

室間精度については、試験により得られた値は2.0~11.1%であったが、0.5 mg/kgの濃度においてHorwitzの式³⁾から16~23%、5 mg/kgの濃度において11~16%と予測された。試験により得られた室間精度とこの予測値の比がHORRAT値³⁾であり、この値が2以下のときには分析法の精度が許容できる範囲とみなされる。今回室間精度を評価できた試験においてHORRAT値は最大0.74であったことか

ら、本法は十分な精度を持つことが確認された。

ま と め

食品中のメラミンの分析法を整備することを目的に、厚生労働省通知の試験法例を基に分析法を作成し、妥当性評価試験を行った。試験法の細部を決定し、また試料により抽出溶媒等を変更するなどの改良を試験法例に加え、分析法を作成した。作成した分析法を用いて、10種類の食品を対象に3名の試験者が異なる実験室で5日間分析を行うことにより妥当性評価試験を行ったところ、おおむね妥当な結果が得られた。

本結果をもとに食品中のメラミンの分析法を整備した。

(本研究は平成21年度食の安心・安全確保緊急対策の一環として実施した。)

文 献

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部：食品安全情報（化学物質）No. 15/2010
<http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/foodinfonews/2010/foodinfo201015c.pdf> (2012年7月12日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：食安監発第1002002号, 食品中のメラミンの試験法について（通知）, 2008.
- 3) 安井明美, 五十君静信, 後藤哲久, 丹野憲二, 湯川剛一郎：最新版食品分析法の妥当性確認ハンドブック, 76-77, 2010, サイエンスフォーラム, 東京.

Examination of the Determination Method of Melamine in Food

Hiroyuki MIYAKAWA^a, Akiko YASUI^a, Yuki SADAMASU^a, Mami OGIMOTO^a, Nahoko HANEISHI^a,
Chigusa KOBAYASHI^a and Yoko UEMATSU^a

In 2008, health impairment, including death, occurred in many babies in China through the ingestion of melamine-contaminated powdered milk. Similar milk beverages containing melamine were also seized in China in 2010, thus the end to this problem is not in sight yet. In such a situation, it was necessary to determine an analysis method for melamine in our institute as well. A method for the analysis of melamine in food based on cleanup with solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry measurement was prepared and evaluated in accordance with the validation performance criteria in the notification on melamine test method issued by the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. The method outlined in the notification was modified slightly, such as increasing the amount of extraction solvent, and extracting some types of samples by water. Subsequently, detailed conditions were determined and validated. In order to introduce the created analysis method into routine analysis, 3 examiners from different laboratories carried out validation of the method on 10 kinds of food spiked with 2 levels of melamine over 5 days. The intermediate precision and reproducibility were also examined. The established method generally satisfied the requirements set out in the notification.

Keywords: melamine, analytical method, determination method, validation, food, LC/MS/MS

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan