

LC-MS/MSによる食品添加物一日摂取量調査試料中のメラミンおよびシアヌル酸の分析

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,
植松 洋子^a

米国食品医薬品局 (FDA) により示された液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた食品中のメラミンとシアヌル酸の分析法を改良し, 食品添加物一日摂取量調査試料に適用した. すなわち, HPLC条件を簡便なアイソクラティック溶離法に変更した. また, 固相抽出カートリッジからの溶出液を濃縮乾固後85% (v/v) アセトニトリルに溶解することにより, 感度と安定性を向上させることができた. 改良した分析法によるメラミンおよびシアヌル酸の定量限界は0.5 µg/g, 検出限界は0.05 µg/gであった.

この分析法を用い, 平成21年に全国6都市の地方衛生研究所で作成された1~8群の幼児用食品添加物一日摂取量調査試料48試料中のメラミンおよびシアヌル酸を分析した. その結果, いずれの試料からも定量限界値以上のメラミンおよびシアヌル酸は検出されなかったが, 第7群の4試料から検出限界値程度のメラミンが確認された.

FDAによる耐容一日摂取量 (TDI) を用いると, 1~6歳の小児が喫食する食品中に許容されるメラミンおよびその関連化合物の量は2.27 µg/gであるが, 今回の結果はこの値を大幅に下回った.

キーワード: メラミン, シアヌル酸, 食品添加物一日摂取量調査試料, LC-MS/MS

はじめに

2008年 (平成20年) に中国において, 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, 死者を含め多数の乳児に被害が及んだ. この事件は, 粉ミルク中の高濃度のメラミンにより腎臓に傷害が及んだものである. 一方シアヌル酸はメラミンの副生成物であり, メラミンと同時にシアヌル酸が存在するときはメラミン単独よりも低い濃度で傷害を起こす可能性がある. このことから, 食品中のメラミンとシアヌル酸の両方の含有量を把握することは重要である. 著者らは前報において, 食品中のメラミンの定量法について報告したが, この方法ではシアヌル酸の定量を行うことはできない.

厚生労働省ではマーケットバスケット方式による食品添加物一日摂取量調査を毎年行っており, 国立医薬品食品衛生研究所と当センターを含む6地方衛生研究所が参加してきた. そこで我々は, 幼児用の一日摂取量調査試料を用いて, FDAにより示されたメラミンとシアヌル酸の分析法の適用性を検討, 改良し, これらの物質の幼児における摂取量を調査することを試みた. その結果, 若干の知見を得たので報告する.

実験方法

1. 試料

平成21年度に国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部から示された加工食品の食品群別リストに基づき, 国内6都市で各種加工食品を購入し, 各都市で8つの群ごとに秤量, 混合した幼児用食品添加物一日摂取量調査試料, 合計48試料. なお, 添加回収試験には, 当センターで作成した試料

をメラミンおよびシアヌル酸が定量限界値未満であることを確認した後用いた. 食品群の概略をTable 1に示した.

2. 試薬および試液

1) 標準品及び標準溶液

メラミン (和光純薬工業 (株) 製) は50% (v/v) アセトニトリルに溶解して100 µg/mLとしたものを標準原液とし, これをさらに希釈して10 µg/mLとした後, 85% (v/v) アセトニトリルを用いて2.5~50 ng/mLに希釈したものを検量線用標準溶液とした. シアヌル酸 (和光純薬工業 (株) 製) はメラミンと同様に操作したが, 検量線用標準溶液濃度は5~100 ng/mLとした. メラミン₁₅N₃ (林純薬工業 (株) 製) は50% (v/v) アセトニトリルに溶解して100 µg/mLとしたものを標準原液とし, これをさらに希釈して

Table 1. Classifications and Daily Intakes of Each Food Groups

Food Group No.	Food Group	No. of foods included	Daily intakes (g/day)
1	Seasonings and beverages	71	200.4
2	Cereals	45	70.2
3	Potatoes, beans and seeds	30	41.6
4	Fish, shellfish and meats	49	31.1
5	Fats, oils and milk	43	49.9
6	Sugars and confectioneries	51	28.6
7	Fruits, vegetables and seaweeds	33	8.3
8	Foods for specified health uses	7	4.4
Total		329	434.5

^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

10 µg/mLとした後85% (v/v) アセトニトリルを用いて2 µg/mLとしたものをメラミン内部標準溶液とした。シアヌル酸 $^{13}\text{C}_3$ (林純薬工業 (株) 製) はメラミン $^{15}\text{N}_3$ と同様に操作し、シアヌル酸内部標準溶液とした。

2) 前処理用カートリッジ

OASIS MCX (150 mg, 粒子径60 µm, Waters社製) は使用前にアセトニトリル, 4%(v/v)ギ酸各5 mLでコンディショニングして用いた。OASIS MAX (150 mg, 粒子径60 µm, Waters社製) は使用前にアセトニトリル, 5% (w/v) アンモニア水各5 mLでコンディショニングして用いた。

3) その他の試薬

アセトニトリルはHPLC用を, その他の試薬は市販特級品を用いた。

3. LC-MS/MS装置及び測定条件

1) 装置

(株) 島津製作所製ProminenceおよびAB SCIEX社製API 4000QTRAP

2) 測定条件

カラム: Cosmosil[®] HILIC (2.0 mm×150 mm, 5 µm), カラム温度: 40°C, 移動相: アセトニトリル・0.02 mol/L酢酸アンモニウム (85:15), 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 5 µL, イオン化モード: メラミン ESI (+); シアヌル酸 ESI (-), 測定モード: Multiple Reaction Monitoring

(MRM) およびProduct ion Scan, MRMモードの質量分析計パラメーターをTable 2に示した。

4. 試験溶液の調製

試料を良く混和した後5.0 gを正確に量り, メラミン $^{15}\text{N}_3$ およびシアヌル酸 $^{13}\text{C}_3$ を各々2.5 µg添加した。30分間放置した後, アセトニトリル・水 (1:1) を15 mL加えた。固体試料は1分間ホモジナイズした。次に15分間振とうした後, 25 mLにメスアップし転倒混和した。これを3,000回転で5分間遠心分離した後, 上清を採取して試料抽出液とした。

メラミン測定用試験溶液を調製するためにさらに以下の

操作を行った。バキュームマニホールドのストップバルブを閉めた状態でOASIS MCXカートリッジに4% (v/v) ギ酸3 mLと試料抽出液2 mLを注入, 混和した後, バルブを開けて自然落下させた。カートリッジをアセトニトリル5 mL, 次いで0.20%(v/v)ジエチルアミン・アセトニトリル溶液5 mLにより洗浄し, 2% (v/v) ジエチルアミン・アセトニトリル溶液4 mLにより溶出した。溶出液を減圧乾固した後, 85% (v/v) アセトニトリル3 mLを加え5分間超音波処理した。これを4 mLにメスアップした後, さらに85% (v/v) アセトニトリルを100 µL加えたものをメラミン測定用試験溶液とした。

シアヌル酸測定用試験溶液を調製するためには以下の操作を行った。バキュームマニホールドのストップバルブを閉めた状態でOASIS MAXカートリッジに5% (w/v) アンモニア水3 mLと試料抽出液2 mLを注入, 混和した後, バルブを開けて自然落下させた。カートリッジをアセトニトリル5 mLにより洗浄し, 4% (v/v) ギ酸・アセトニトリル溶液2 mLにより溶出した。溶出液を減圧乾固した後, 85% (v/v) アセトニトリル1 mLを加え5分間超音波処理した。これを2 mLにメスアップした後, さらに85% (v/v) アセトニトリルを100 µL加えたものをシアヌル酸測定用試験溶液とした。

5. 定量

メラミンとシアヌル酸の測定は個別に行った。定量はMRMモードを用い, メラミン $^{15}\text{N}_3$, シアヌル酸 $^{13}\text{C}_3$ をそれぞれ内部標準物質とする内部標準法を用いた。定量に用いたイオンは, メラミンが m/z 127>85, メラミン $^{15}\text{N}_3$ が m/z 130>87, シアヌル酸が m/z 128>41, シアヌル酸 $^{13}\text{C}_3$ が m/z 131>43である。メラミン検量線用標準溶液4 mLにメラミン内部標準溶液100 µLを加えたものを用いメラミンの検量線を, また, シアヌル酸検量線用標準溶液2 mLにシアヌル酸内部標準溶液100 µLを加えたものを用いシアヌル酸の検量線を作成し, それぞれの検量線から試験溶液中のメラミンおよびシアヌル酸の濃度を求めた。

結果及び考察

1. LC-MS/MS測定条件

1) LC条件

カラムはCosmosil[®] HILICを用いた。移動相は, 厚生労働省の通知²⁾やFDAのLIB No. 4422³⁾を参考にするとともにピーク形状や試料の溶解性を考慮して, アセトニトリル・0.02 mol/L酢酸アンモニウム (85:15) を用いることにした。また, 上記の試験法はグラジェント溶離法を用いているが, 今回用いたカラムにおいては特にその必要が無かったため, 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。

Table 2. Compound-Specific Parameters of LC-MS/MS for 4 Kinds of Compounds (MRM)

Compounds	m/z	DP(V)	CE(V)
Melamine	127>85*	61	27
	127>68	61	45
	127>43	61	55
Melamine $^{15}\text{N}_3$	130>87*	66	27
	130>44	66	47
	130>69	66	43
Cyanuric acid	128>41*	-45	-28
	128>84	-45	-14
Cyanuric acid $^{13}\text{C}_3$	131>43*	-35	-28
	131>86	-35	-14

DP:Declusterling Potential CE:Collision Energy

*.used for quantification

Table 3. Recoveries of Two Kinds of Compounds from Spiked Samples

Food group No.	Recovery ^{a)} (mean±SD%)	
	melamine	cyanuric acid
1	98.3±2.5	96.9±2.6
2	99.5±0.7	98.9±2.7
3	99.5±2.1	107.4±8.1
4	100.1±2.0	105.7±4.2
5	98.6±1.0	100.0±1.5
6	103.6±1.3	102.2±1.7
7	111.9±1.4	102.8±1.5
8	100.8±2.3	97.5±1.3

a) 0.5 µg/g of each compound was spiked to samples. Results of 3 trials.

2) MS/MS条件

メラミンのスクリーニングには、 m/z 127をプリカーサーイオン、 m/z 85, 68, 43をプロダクトイオンとするMRMモードを用い、このうち m/z 85を定量用イオンとして用いた。メラミンの確認には、 m/z 127をプリカーサーイオンとするProduct ion scanningを行い、標準品と同様のマススペクトルを確認した。

シアヌル酸のスクリーニングには、 m/z 128をプリカーサーイオン、 m/z 41, 84をプロダクトイオンとするMRMモードを用い、このうち m/z 41を定量用イオンとして用いた。

2. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は、FDAのLIB No. 4422³⁾を参考にして行ったが、より容易に分析を行うことができるように一部変更した。

まず、LIB No. 4422では試料5.0 gに抽出溶媒20 mLを加え、得られた試料抽出液の一定量をさらに固相抽出している。しかし、試料の中には水分含有量の多いものもあるため5.0 gの試料に抽出溶媒を15 mLに加えホモジナイズ後、25 mLにメスアップすることにした。このように定容することにより計算が容易になった。

また、LIB No. 4422ではメラミン、シアヌル酸とも固相抽出カートリッジからの溶出液をLC-MS/MS用の試験溶液としているが、メラミンの分析においては満足する感度を得ることができなかった。これはカートリッジからの溶出液がアルカリ性のためにメラミンのイオン化が抑制されるためと考え、溶出液を濃縮乾固した後、85%(v/v)アセトニトリルに溶解することにしたところ、良好な結果を得ることができた。

さらに、LIB No. 4422の方法によりシアヌル酸を分析したところ、保持時間が変動し、また妨害が多く分析が困難になることがあった。そこで、メラミンと同様に溶出液を濃縮乾固した後、85%(v/v)アセトニトリルに溶解したところ、良好な結果を得ることができた。これは、LIB No. 4422の方法では、カートリッジからの溶出液が酸性のため

Table 4. Contents of Melamine in Total Diet Study Samples

Laboratory	Food group No.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND
B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND
C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND
D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND

ND: < 0.05 µg/g Tr: 0.05 µg/g ≤, < 0.5 µg/g

にシアヌル酸のイオン化を抑制した等の理由が考えられた。

3. 検量線

実験方法に従い、内部標準法により検量線を作成した。その結果、メラミンは2.5~50 ng/mL、シアヌル酸は5~100 ng/mLの範囲で直線性を示した (r=0.999)。

4. 添加回収試験

当センターで作成した幼児用食品添加物一日摂取量調査試料の各群に、メラミンおよびシアヌル酸がそれぞれ試料中に0.5 µg/gになるように添加後30分間放置し、本法に従って回収率を求め、その結果をTable 3に示した。メラミン、シアヌル酸とも96.9~111.9%と良好な回収率が得られ、変動係数は10%未満であった。

本法による定量限界は、メラミン、シアヌル酸とも試料当たり0.5 µg/g、検出限界は0.05 µg/gであった。

5. 一日摂取量調査試料中のメラミンおよびシアヌル酸の分析

本法を用いて平成21年に全国6都市の地方衛生研究所で作成された1~8群の幼児用食品添加物一日摂取量調査試料48試料中のメラミンおよびシアヌル酸を分析した結果をTable 4およびTable 5に示した。

いずれの試料からも定量限界値以上のメラミンおよびシアヌル酸は検出されなかった。

4試料からは検出限界値程度のメラミンを確認することができた。これらはいずれも第7群であった。欧州食品安全機関 (EFSA) によると、食品と接触する物質からの移行により食品がメラミンに汚染される原因として、メラミンを含む食料缶コーティング、接着剤やその他の色々な食品包装材が挙げられている。その他、食品がメラミンに汚染

Table 5. Contents of Cyanuric Acid in Total Diet Study Samples

Laboratory	Food group No.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND:<0.05 µg/g

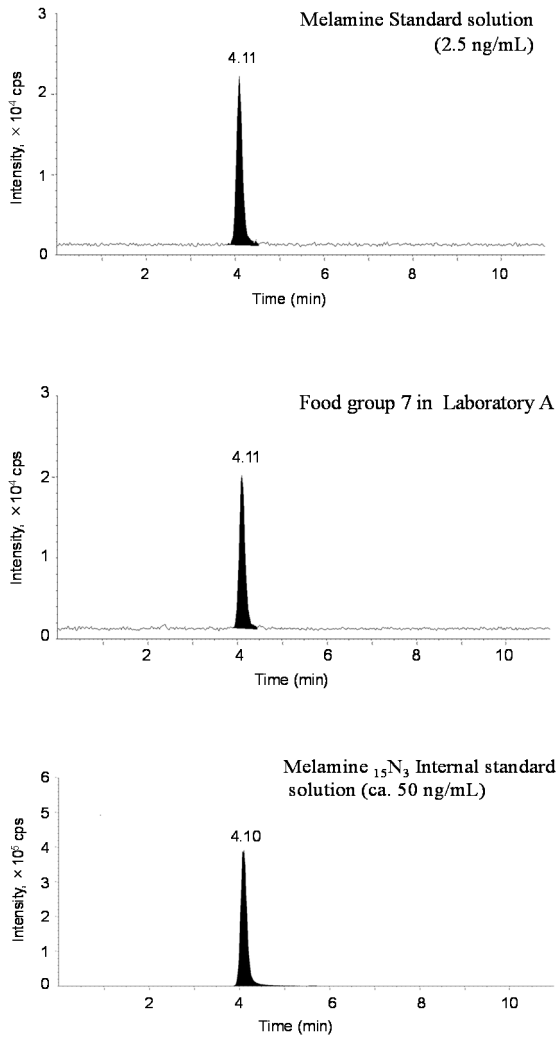


Fig. 1. MRM Chromatograms of Melamine Standard Solution, Positive Sample Solution (m/z 127>85), and Melamine $^{15}\text{N}_3$ Internal Standard Solution (m/z 130>87)

される要因として、殺虫剤のシロマジンの分解によるメラミンの生成も挙げられている⁴⁾。また、我が国でメラミンは肥料として登録されたことはないが、海外では肥料にも用いられている⁵⁾。

さらに平成23年に、農作物の生産に肥料および農薬として使用される石灰窒素水和造粒品にメラミンが含まれていることが判明し農作物のメラミン汚染が危惧された。これは、石灰窒素の主成分であるカルシウムシアナミドが水和造粒過程において水を加えることにより加水分解してシアナミドとなり、その際の発熱により一部のシアナミドが3個結合してメラミンが生成されるものである。農林水産省は関係業者に当該製品の出荷自粛と自主回収を指導し、その後、コーデックス委員会が定めた食品中のメラミンの最大基準値 (2.5 mg/kg) を超過しない石灰窒素中のメラミン濃度の暫定的な許容値 (0.4%) を設定するとともに、出荷自粛を解除した⁶⁾。

今回メラミンが確認された第7群は、野菜や果物の缶詰、野菜の漬物、野菜や海草の惣菜、味付け海苔等から構成さ

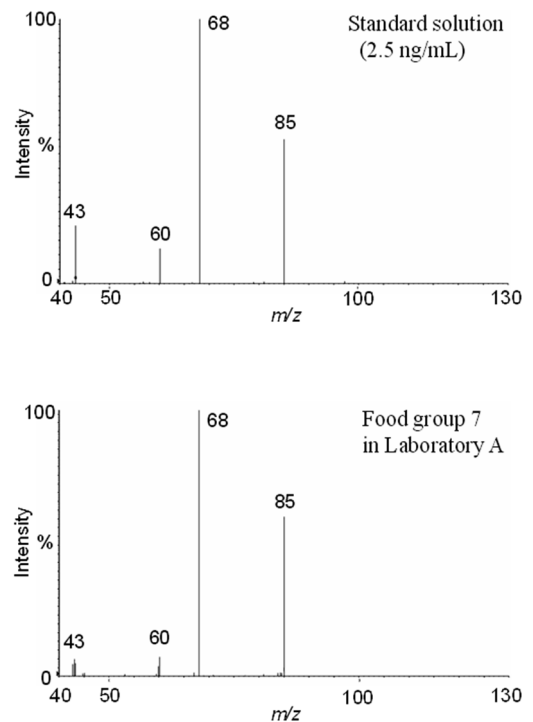


Fig. 2. MS Spectra of Melamine in Standard Solution and Positive Sample Solution, using Product Ion Scanning (Precursor Ion: m/z 127)

れており、確認されたメラミンの由来としては以上のとおり、食品と接触する物質からの移行、殺虫剤の分解によるメラミンの生成、肥料へのメラミンの使用、肥料および農薬へのメラミンの混入が考えられた。

Fig. 1にメラミン、メラミン $^{15}\text{N}_3$ およびメラミンが確認された試料のMRMクロマトグラムを、Fig. 2にProduct ion scanningによるマスペクトルを示した。また、Fig. 3にシアヌル酸、シアヌル酸 $^{13}\text{C}_3$ および陰性試料のMRMクロマトグラムを示した。

今回得られた結果は、メラミン、シアヌル酸ともいずれの食品群においても0.5 $\mu\text{g/g}$ 未満、多くは0.05 $\mu\text{g/g}$ 未満であった。これは、EFSAの報告⁴⁾とほぼ同様であった。一方、FDAによると、メラミンおよびその関連化合物の耐容一日摂取量 (TDI) は0.063 mg/kg体重/日である⁷⁾。1~6歳の小児の体重を15.7 kgとすると、今回の調査における1日あたりの喫食量434.5 gから、食品中に許容されるメラミンおよび関連化合物の量は2.27 $\mu\text{g/g}$ であるが、今回の結果はこの値を大幅に下回った。

ま と め

1. FDAにより示された食品中のメラミンとシアヌル酸の分析法を改良した。すなわち、HPLC条件は簡便なアイソクラティック溶離法に変更した。また、固相抽出カートリッジからの溶出液を濃縮乾固後85% (v/v) アセトニリルに溶解することにより、感度と安定性を向上させることができた。改良した試験法によるメラミンおよびシアヌル酸の定

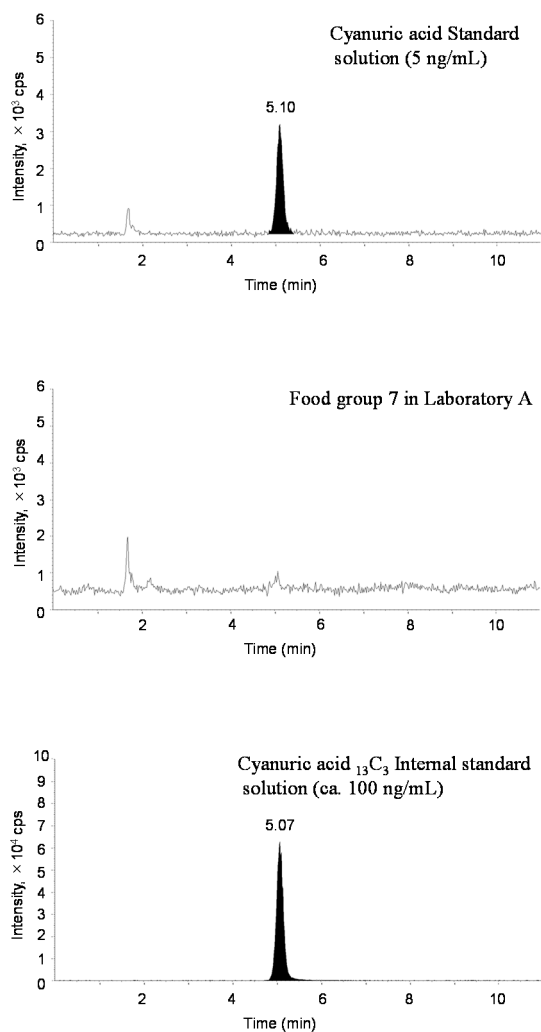


Fig. 3. MRM Chromatograms of Cyanuric Acid Standard Solution, Negative Sample Solution (m/z 128>41), and Cyanuric acid $^{13}\text{C}_3$ Internal Standard Solution (m/z 131>43)

量限界は0.5 $\mu\text{g/g}$, 検出限界は0.05 $\mu\text{g/g}$ であった.

2. 改良した分析法を用い, 平成21年に全国6都市の地方衛生研究所で作成された1~8群の幼児用食品添加物一日摂取

量調査試料48試料中のメラミンおよびシアヌル酸を分析した. その結果, いずれの試料からも定量限界値以上のメラミンおよびシアヌル酸は検出されなかったが, 第7群の4試料からは検出限界値程度のメラミンを確認することができた.

3. FDAによるTDIから求めた1~6歳の小児が喫食する食品中に許容されるメラミンおよびその関連化合物の量は2.27 $\mu\text{g/g}$ であるが, 今回の結果はこの値を大幅に下回った.

(本研究の概要は平成23年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部理化学研究部会2012年2月で発表した.)

文 献

- 1) 宮川弘之, 安井明子, 貞升友紀, 他: 東京健安研七 年 報, **63**, 167-172, 2012.
- 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1002003号, 食品中のメラミンの試験法について, 2008.
- 3) FDA: Laboratory Information Bulletin No. 4422, 2008
- 4) European Food Safety Authority: EFSA Journal 2010, **8**(4), 1573, 2010
- 5) 食品安全委員会: メラミン等による健康影響について, <http://www.fsc.go.jp/fsciis/meetingMaterial/show/kai20081218sfc> (2014年8月18日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 6) 農林水産省消費・安全局農産安全管理課: 石灰窒素中のメラミンの暫定許容値の設定について, http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_hiryu/cacn_melamine/ (2014年8月15日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 7) FDA: Interim Safety and Risk Assessment of Melamine and its Analogues in Food for Humans [a]. <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/ChemicalContaminants/ucm164522.htm> (2014年7月11日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)

Determination of Melamine and Cyanuric Acid in Total Diet Study Samples for Food Additives by LC-MS/MS

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

The standard method for the analysis of melamine and cyanuric acid in foods using liquid chromatography tandem-mass-spectrometry (LC-MS/MS) recommended by the Food and Drug Administration (FDA) was improved. It was subsequently applied to the samples in a Total Diet Study of food additives. The HPLC conditions were changed to simple isocratic conditions. The sensitivity and stability of the method were improved by dissolving the evaporation residue of the eluate from the solid-phase extraction cartridge in an 85% (v/v) acetonitrile solution. The quantitation limit for melamine and cyanuric acid was 0.5 µg/g, and the detection limit was 0.05 µg/g. The melamine and cyanuric acid amounts in the samples from 48 Total Diet Studies of 8 groups for small children, that were prepared in 6 laboratories of public health in Japan in 2009, were investigated by the new method. The melamine and cyanuric acid in any samples did not exceed the quantitation limit, although, melamine slightly over the detection limit was detected in 4 samples of the 7th group. Calculating from tolerable daily intake(TDI) set by FDA, the acceptable level of melamine and its related compounds in the foodstuff for 1~6 years old children, is 2.27 µg/g. The result of this study was much lower than this level.

Keywords: melamine, cyanuric acid, total diet study samples for food Additives, LC-MS/MS

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan