

中国産加工食品中のメラミンの分析について

生活衛生部門

Studies on Determination of Melamine in Food Products Processed in China

Division of Food and Environmental Hygiene

Abstract

Screening method was studied for the analysis of melamine and cyanuric acid in food using HPLC and GC/MS.

The method for detecting melamine involved the extraction of 5 g sample with 24 mL of acetonitrile:water(1:1) and 1mL of 1M hydrochloric acid, followed by SCX SPE cartridge clean-up step. Samples were derivatized with BSTFA with 1% TMCS for GC/MS analysis. Extracts were analyzed by HPLC-UV and GC/MS. The average recovery of melamine from 1µg/g fortified sample(n=5) was 109.4%with RSD of 15.9% in GC/MS analysis. Using this method, 23.4 ppm and 4.6 ppm of melamine were detected from “Cream Panda”, food product which were processed in china, and sold to two nursing homes in Kyoto city. The method for detecting cyanuric acid involved the extraction of 2 g sample with 20 mL of acetonitrile:water(1:1), followed by MAX SPE cartridge clean-up step. Samples were derivatized with BSTFA with 1% TMCS for GC/MS analysis. Extracts were analyzed by GC/MS. The recovery of cyanuric acid from 10 µg/g fortified sample was 103.3%, 97.9%, 86.8% for three kinds of food products.

Key Words

melamine メラミン, cyanuric acid シアヌル酸, processed food 加工食品, GC/MS ガスクロマトグラフィー/質量分析法, HPLC 高速液体クロマトグラフィー

1 はじめに

メラミンは、メラミン樹脂や塗料、コーティング剤、接着剤等の原料に使用される工業用化学物質である。本来食品に使用されることのない物質であるが、構造式に窒素原子を多く含むため、食品中のタンパク質含量を偽るために不正に添加され、乳・乳製品及び粉末状たん白質並びにそれらを使用した食品への汚染が世界的な問題となった。2007年3月に、米国で、輸入ペットフードに添加されていたメラミンが原因とされるペットの死亡事件が発生した。また、2008年9月には、中国でメラミンが不正に混入された乳幼児用粉乳が原因と思われる乳幼児等の大規模な健康被害事例が発生した。死亡したペットの分析結果から、食品に混入されたメラミンがその副生物であるシアヌル酸と同時に存在することでメラミンシアヌレート結晶を生じ、この結晶が腎機能障害を引き起こしたと考えられている。表1、表2にメラミン及びシアヌル酸の物性を示す。

2008年9月下旬、大阪府の食品加工会社の5種類の中国製加工食品について、メラミン汚染牛乳を製造していた業者の牛乳を原材料として使用していることが判明し、自主回収が行われ、日本国内にも、メラミンに汚染された可能性のある食品が流通していることが明らかになった。京都市でも、メーカーの自主回収の情報をもとに、当該加工食品の流通状況を調査したところ、回収対象品の「業務用クリームパンダ」が京都市内の社会福祉施設

2 施設に残っていることが判明した。

当該品について、当研究所でメラミンの検査を実施した事例について報告する。また、シアヌル酸についても検査法の検討を行ったので報告する。

表1 メラミンの物性

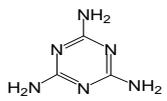
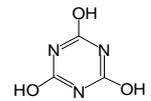
(1) 和名	メラミン
(2) CAS No	108-78-1
(3) 分子式	C ₃ H ₆ N ₆
(4) 分子量	126.1
(5) 構造式	
(6) 性状	無色～白色の結晶、密度は1574 kg/m ³ 、水への溶解度は0.31 g/100ml
(7) TDI 耐用一日摂取量	(FDA) 0.63mg/kg 体重/日(メラミンとして) ※メラミンとシアヌル酸の複合影響に関する不確実性を考慮した参照値:0.063mg/kg体重/日(TDI/10) (EFSA) 0.5mg/kg 体重/日(メラミン及び関連化合物全体として) (WHO) 0.2mg/kg 体重/日(メラミンとして)

表2 シアヌル酸の物性

(1) 和名	シアヌル酸
(2) CAS No	108-80-5
(3) 分子式	C ₃ H ₃ N ₃ O ₃
(4) 分子量	129.1
(5) 構造式	
(6) 性状	無臭で白色の吸湿性の結晶性粉末、密度は2.5g/cm ³ 、水への溶解度は0.27 g/100ml
(7) TDI 耐用一日摂取量	(WHO) 1.5mg/kg 体重/日(シアヌル酸として)

2 方法

(1) 試料

京都市内の2施設に残っていた「業務用クリームパンダ」2検体(以下、検体No. 01, 検体No. 02と記す。)を検査した。メラミンの添加回収試験に京都市内に流通していたクリームパンを、シアヌル酸の添加回収試験にクリームパン、乳幼児用粉ミルク、冷凍いかやきを用いた。

(2) 標準

メラミン標準品 和光純薬工業製, 50%アセトニトリル水溶液で100 μ g/mL標準溶液を作成し使用した。

シアヌル酸標準品 和光純薬工業製, 50%アセトニトリル水溶液で100 μ g/mL標準溶液を作成し使用した。

$^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ 標識シアヌル酸 100 μ g/mL 水溶液(内部標準用)CambridgeIsotopeLabs製を使用した。

(3) 試薬

アセトニトリル: 和光純薬工業製, 残留農薬用

蒸留水: 純水製造装置で製造したものを用いた。

50%アセトニトリル水溶液: アセトニトリルと蒸留水を1:1で混合して使用した。

メタノール: 残留農薬用, ナカライテスク

ジクロロメタン: 残留農薬用, ナカライテスク

1 mol/L 塩酸: 試薬特級 林純薬製

0.1 mol/L 塩酸: 1 mol/L 塩酸を純水で10倍に希釈した。

アンモニア水: 有害金属測定用, 林純薬

0.5%アンモニア水含有メタノール: アンモニア水をメタノールで希釈して使用した。

固相カートリッジ(陽イオン交換カラム): VARIAN, BOND ELUT JR-SCX 500mg PART#1216204013 (メラミン用)

固相カートリッジ(陰イオン交換カラム): Waters Oasis MAX 500mg PART#186000776 (シアヌル酸用)

ピリジン(脱水): 有機合成用 和光純薬工業

ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド(BSTFA): ナカライテスク

トリメチルクロロシラン(TMCS): ナカライテスク製

(4) 試料の前処理

試料の前処理は, 2007年のペットフードへのメラミン混入事件の際に米国食品医薬品庁(FDA)が発表した文献⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾を参考に, 当所で改良を加え以下のとおり行った。

ア メラミン⁽²⁾⁽³⁾

均一化した試料5.0gを50mLポリプロピレン遠沈管に量り採り, 50%アセトニトリル水溶液24mL, 1.0M塩酸1mLを加え, 30秒手で振とうし, 1分間ボルテックスミキサーで混合後, 4000rpmで5分間遠心分離した。上清5mLを15mLポリプロピレン試験管に移

し, ジクロロメタン10mLを加え, 2分間振とう後, 4000rpmで5分間遠心分離した。上層の水層2.5mLを10mL試験管に移し, 下層のジクロロメタン層に精製水2.5mLを加え, 1分間振とうし, 4000rpmで5分間遠心した。上層の水層を全量, 10mL試験管に移し, 水層を合わせ, 10秒間ボルテックスミキサーで混合した。SCX(500mg)ミニカラムにメタノール5mL, 精製水5mLを加え, コンディショニング後, 上記で得られた水層を負荷し, 0.1mol/L塩酸5mL, メタノール2mLで洗浄した。1分間カラムを吸引乾燥した後, 5%アンモニアメタノール5mLで溶出した。溶出液を窒素パージで濃縮乾固した残留物に50%アセトニトリル水溶液1mLを加え, 0.45 μ mのフィルターでろ過後, HPLC用試験溶液とした。HPLC用試験溶液を500 μ L採取し, 窒素パージにより乾固後, ピリジン(脱水)300 μ L及びBSTFA-TMCS(99+1)200 μ Lを加えてボルテックスミキサーで混合し, 栓をして密封した。70 $^{\circ}$ Cの水浴中で45分間加熱したのち, 放冷し, GC/MS用試験溶液とした。

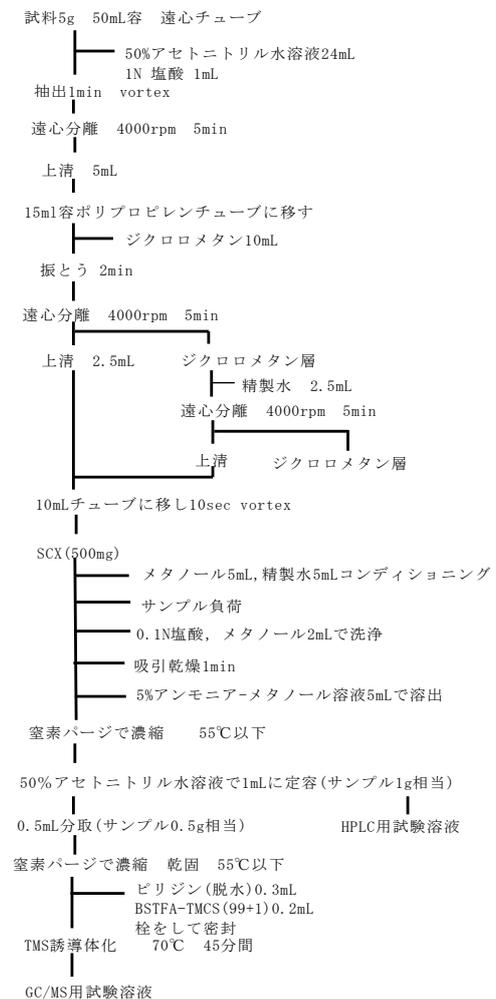
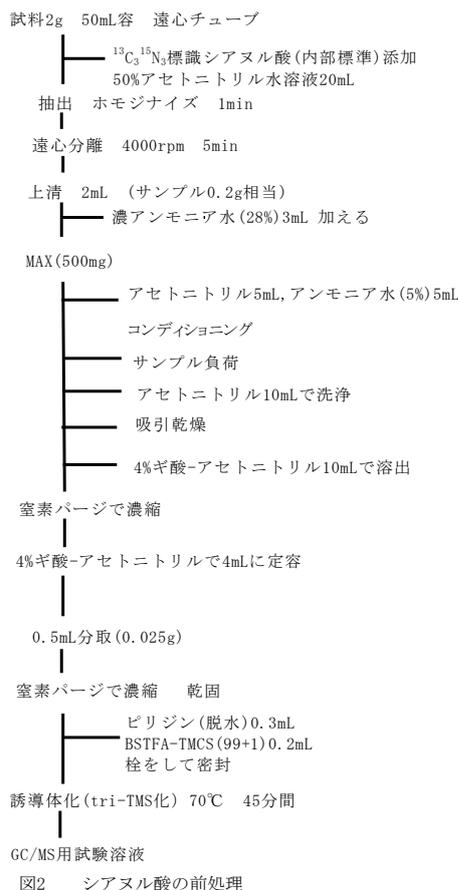


図1 メラミンの前処理

イ シアヌル酸⁴⁾

均一化した試料 2.0g を 50mL ポリプロピレン遠沈管に量り採り、シアヌル酸内標準品 ($^{13}\text{C}_3$, 99%; $^{15}\text{N}_3$, 98%) 水溶液 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 50%アセトニトリル水溶液 20mL を加え 30 秒手で振とうした後、1 分間ボルテックスミキサーで混合後、4000rpm で 5 分間遠心分離した。上清 2mL を 10mL 試験管に移し、濃アンモニア水 3mL を加える。アセトニトリル 5mL, 5%アンモニア水 5mL でコンディショニングした MAX (500mg) ミニカラムに上清を負荷し、アセトニトリル 10mL で洗浄後、4%ギ酸-アセトニトリル 10mL で溶出した。窒素パージで濃縮し、4mL に定容後、500 μL を採取し、窒素パージにより乾固後、ピリジン (脱水) 300 μL 及び BSTFA-TMCS (99+1) 200 μL を加えてボルテックスミキサーで混合し、栓をして密封する。70 $^{\circ}\text{C}$ の水浴中で 45 分間加熱したのち、放冷し、GC/MS 用試験溶液とした。



3 結果及び考察

(1) メラミンの HPLC-PDA による分析の検討

「業務用クリームパンダ」中のメラミンについて、まず、FDA の HPLC-UV 法⁽¹⁾を参考に、簡便性、迅速性に優れる HPLC-PDA による分析を検討した。メラミン (表

1) はトリアジン環と 3 つのアミノ基を有する、極性の高い塩基性化合物であるため (共役酸の $\text{pK}_a=5.0$)、HPLC で汎用される ODS カラムの逆相モードでの保持が困難な物質である。そのため、メラミンの分離を改善するため、移動相にイオンペア試薬としてオクタンスルホン酸ナトリウムを加え、イオンペアクロマトグラフィーによる分析を行った。分析条件は表 3 のとおりである。検体の前処理は検体 No. 01, 検体 No. 02 ともに 5 回繰り返し試行 ($n=5$) で行った。

FDA の HPLC-UV 法の前処理方法は、50%アセトニトリルで抽出、ろ過後、希釈して測定する簡便な方法であるが、今回の検査対象が加工食品 (クリームパン) であり、脂質等の夾雑成分が多く含まれるため、FDA の HILIC-LC/MS の前処理法を参考に、50%アセトニトリル抽出液をジクロロメタンで脱脂後、強陽イオン交換体ミニカラム (SCX500mg) による精製を行ってから測定を行った。メラミンの標準を SCX カラムに負荷し 5%アンモニア-メタノールによる溶出分画を確認したところ 5mL までにメラミンが溶出することが確認できたため、5%アンモニア-メタノールによる溶出量を 5mL とした。検出感度を上げるため、FDA の条件よりも試料を濃縮した条件 (最終試験液中の試料濃度 1g/mL) で測定を行った。

表 3 の測定条件でのメラミン保持時間は 5.00 分であった。標準系列を 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で、標準系列を 4 点 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作成し、検量線を作成した。相関係数は 0.9991 であり、良好な直線性が得られた (図 3)。最終試験液中の試料濃度 1g/mL の測定では、検量線の最小濃度の標準 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は試料中濃度に換算して 0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ に相当する。FDA の HPLC-UV 法の検出限界 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ に比較して高感度に測定することができた。

表3 HPLC-PDA測定条件

装置	SHIMADZU LC-10
カラム	Zorbax RxC8 (4.6 x 150 mm, 5 μm)
カラム温度	40 $^{\circ}\text{C}$
流速	1mL/分
移動相	A/B=85/15 A : 10mMオクタンスルホン酸ナトリウムを含む10mMクエン酸緩衝液 B : アセトニトリル
注入量	10 μL
検出器	SPD-M10A
測定波長	200-400nm (メラミンの $\lambda_{\text{max}}=236\text{nm}$)
検出波長	240nm

図4, 図5にメラミン標準及び, 検体 No. 01, 検体 No. 02 の HPLC-PDA 測定のコロマトグラム及び紫外吸収スペクトルを示す。

検体 No. 01, 検体 No. 02 ともにメラミンの標準と保持時間が一致するピークが得られたが, 検体 No. 01 は検量線の範囲を超えたため, 10 倍希釈してから再測定した。

検体 No. 01, 検体 No. 02 の定量結果を表4に示す。

希釈して測定したため, 検体 No. 01 (最終試験液中の試料濃度 0.1g/mL) の紫外吸収スペクトルはマトリックスの影響が少なく, 236nm 付近の極大波長が確認でき, メラミン標準とよく一致した。検体 No. 02 (最終試験液中の試料濃度 1g/mL) のスペクトルは, マトリックス中の夾雑成分と重なったため紫外吸収スペクトルによる定性の確認は困難であった。

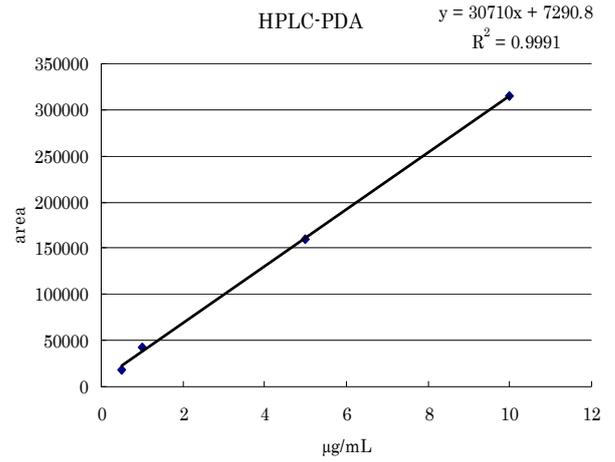


図3 メラミンの検量線 0.5µg/mL-10µg/mL HPLC-PDA

表4 クリームバンド中メラミンのHPLC測定結果 (n=5)

	試料中濃度µg/g (平均値)	標準偏差	%RSD
検体No01	26.31	1.67	6.33
検体No02	7.86	0.39	5.02

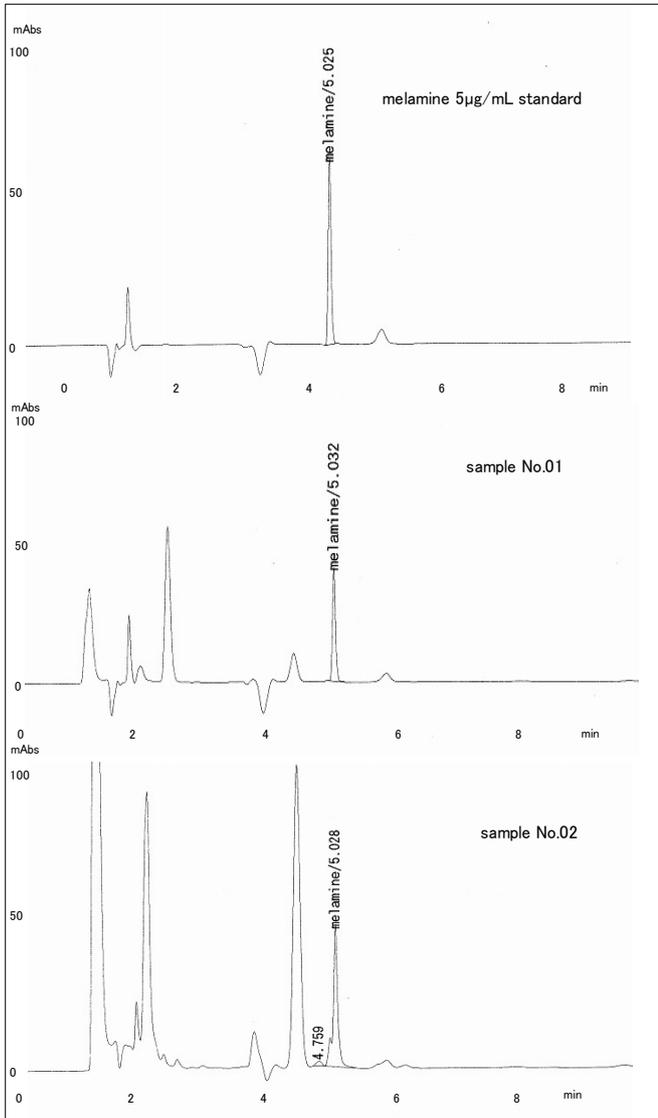


図4 melamine のHPLCクロマトグラム (240nm)

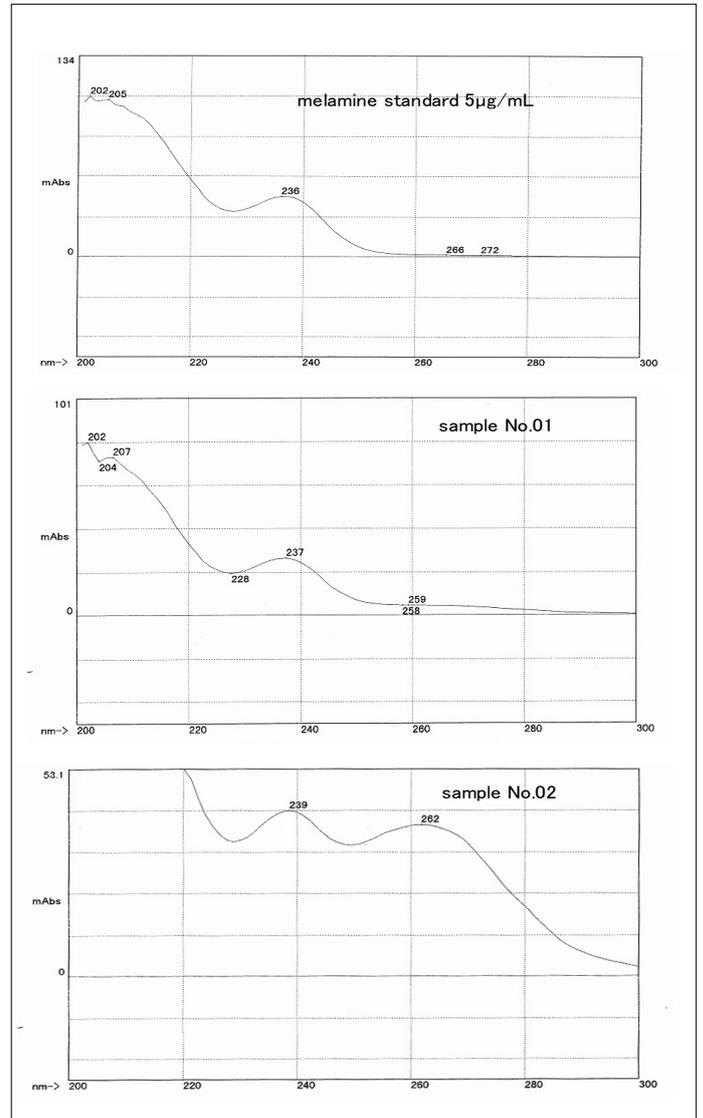


図5 melamineのPDAスペクトル

(2) 食品中メラミンのGC/MSによる分析の検討

HPLC-PDA分析で検体 No. 01, No. 02ともにメラミンの検出が疑われる結果が得られたため、GC/MS測定による確認、定量を行った。また、メラミンは、3つのアミノ基を有し、極性が大きい化合物であるため、GC/MSで分析するには、誘導体化を行い、揮発性を向上させる必要がある。HPLC用試験溶液を、500μL採取し、窒素ページにより乾固後、ピリジン(脱水)300μL及びBSTFA-TMCS(99+1)200μLを加えて70℃で45分加熱し、アミノ基をトリメチルシリル化(TMS化)してGC/MSで測定した(図6)。まず、GC/MS-SCAN測定により定性の確認、定量を行い、その後、GC/MS/MS測定により定性の確認を行った。GC/MSの測定条件は表5のとおりである。

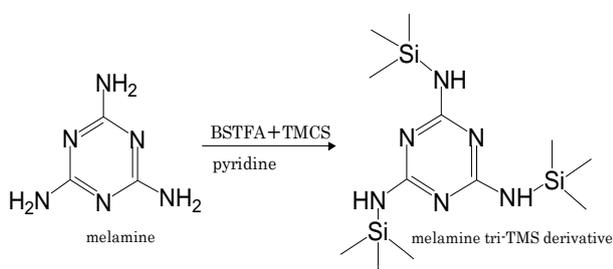


図6 メラミンのTMS化

表5 GC/MS測定条件

GC機器	TRACE GC Ultra (ThermoQuest)
MS機器	PolarisQ(ThermoQuest)
GCカラム	関東化学製ENV-5MS(30m, 0.25mm id,膜厚0.25μm)
カラム温度	75℃(1分)→(15℃/分)→320℃(20分)
注入口温度	75℃(3分)→(14.5℃/秒)→260℃(5分)→(14.5℃/秒)→300℃(5分)
キャリアガス	He1mL/min
イオン源温度	230℃
イオン化法	EI
注入方法	PTVsplitless注入法, splitless3min splitless flow 50mL/min
注入量	1μL
MS条件	
SCAN測定	m/z=50-500
定量イオン(MELscan)	m/z=327,342,171
定量イオン(CYAscan)	m/z=345,330
MSMS測定	メラミン:327@(CE1.0,Q0.3)→[140-337]
定量イオン(MEL msms)	m/z=285,171
	シアヌル酸:345@(CE1.0,Q0.3)→[150-354]
定量イオン(CYAmsms)	m/z=330,345

標準系列を5点(0.04μg/mL, 0.2μg/mL, 0.4μg/mL, 0.8μg/mL, 2μg/mL)50%アセトニトリル水溶液で調製した後、500μL採取し、試料と同様の条件で誘導体化して測定(GC/MS-SCAN測定)し、検量線を作成した。(図7)相関係数は、0.9924であり、直線性は良好であった。最終試験液中の試料濃度1g/mLの測定では、検量線の

最小濃度の標準0.04μg/mLは、試料中濃度に換算して0.04μg/gに相当する。

表6に市販クリームパンでのメラミンの添加回収試験(n=5)の結果を示す。添加濃度は、1μg/gで最終試験液中の試料濃度1g/mLの条件でGC/MSで測定した。回収率の平均が70%以上120%以下、相対標準偏差20%以内の良好な結果が得られたが、添加回収の平均値が100%を超えていた。これは、試料マトリックスの影響により感度が上昇したためであると考えられる。

図8にGC/MS-SCAN測定での標準品及び検体No. 01, 検体No. 02のクロマトグラム及びMSスペクトルを示す。検体No. 01, 検体No. 02ともに、メラミンの標準品と保持時間が一致するピークが得られ、MSスペクトルも一致した。図9にGC/MS/MS測定での標準品及び検体No. 01, 検体No. 02のクロマトグラム及びMSスペクトルを示す。GC/MS/MS測定においても、検体No. 01, 検体No. 02ともに、メラミンの標準品と保持時間、MSスペクトルも一致し、検体からメラミンが検出していることが確認できた。

表7にGC/MS-SCAN測定での検体No. 01, No. 02の定量結果(n=5)を示す。検体No. 01, No. 02ともにHPLC用試験液(試料濃度1g/mL)を誘導体化して測定した結果、検量線の範囲を超えたため、検体No. 01は20倍希釈(試料濃度0.05g/mL)、検体No. 02は10倍希釈(試料濃度0.1g/mL)してから誘導体化を行い、測定した。GC/MSによる測定のほうが高感度に分析可能であり、MSスペクトルにより、確実に定性が確認できたため、GC/MSによる測定値を成績値として採用した。(検体No. 01の成績値23.2mg/kg, 検体No. 02の成績値4.6mg/kg)

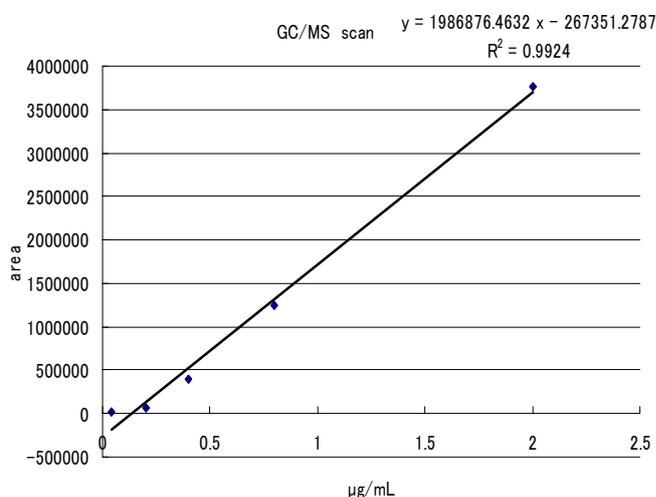


図7 melamine検量線0.04μg/mL-2μg/mL GC/MS-SCAN

表6 クリームパン中メラミンの添加回収試験結果 (n=5)

	回収率% (平均値)	標準偏差	%RSD
melamine	109.39	17.45	15.95

表7 クリームパンダ中メラミンのGC/MS測定結果 (n=5)

	試料中濃度 $\mu\text{g/g}$ (平均値)	標準偏差	%RSD
検体No01	23.19	3.89	16.78
検体No02	4.63	0.56	12.17

E:\data_el...\no07x10-1

2008/09/27 2:47:30

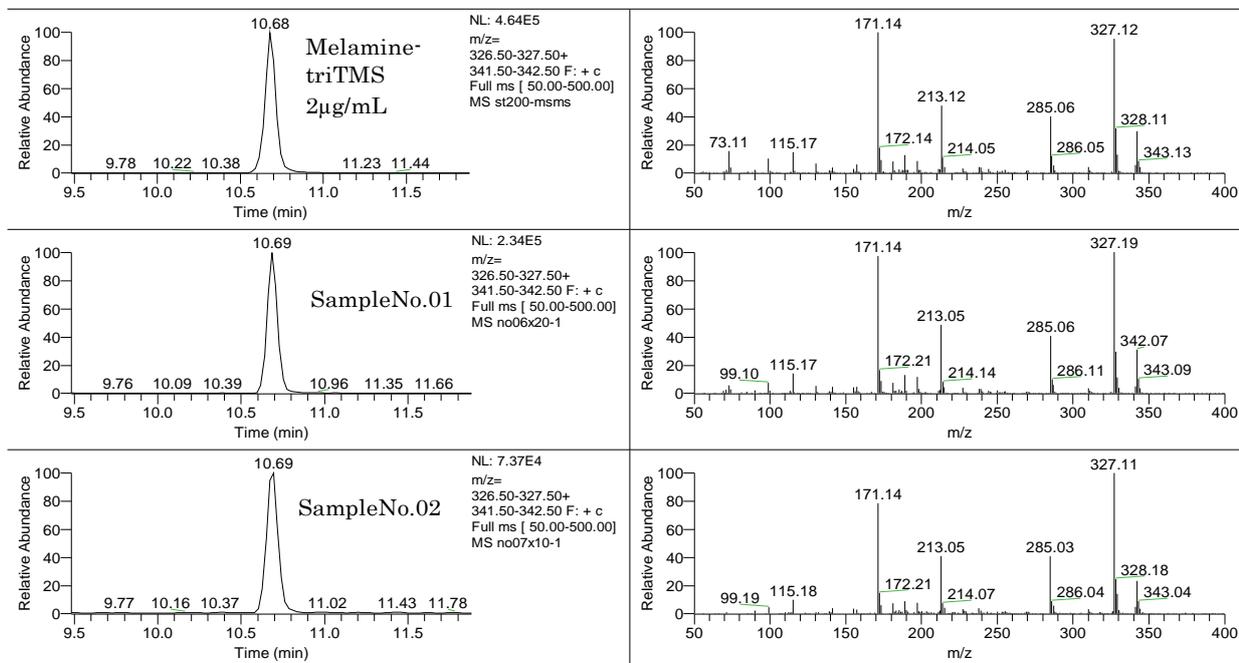


図8 melamine GC/MS-SCAN 測定のカロマトグラム及びMSスペクトル

E:\data_el...\no07x10-1

2008/09/27 2:47:30

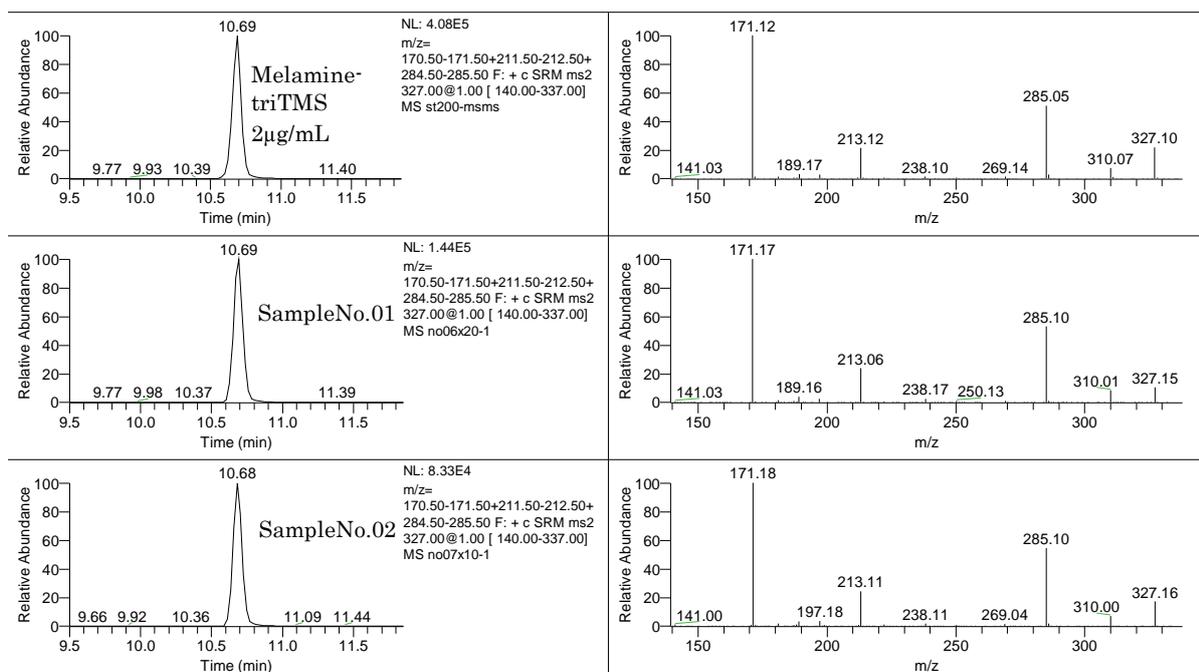


図9 melamine GC/MS/MS 測定のカロマトグラム及びMSスペクトル

(3) クリームパンダ中のメラミンの検出濃度の評価

体重 60kg の人が 1 日当たり許容できるメラミンの摂取量は、米国食品医薬品庁 (FDA) の暫定リスク評価によるメラミンの TDI※0.63/mg/kg 体重/日を適用すると、 $0.63 \times 60 = 37.8\text{mg}$ となる。欧州安全機関 (EFSA) の暫定リスク評価によるメラミン及び関連化合物全体の TDI0.5/mg/kg 体重/日を適用すると、 $0.5 \times 60 = 30\text{mg}$ となる。また WHO が 2008 年 12 月に設定したメラミンの TDI0.2mg/kg 体重/日を適用すると、 $0.2 \times 60 = 12\text{mg}$ となる。このため、今回、検出されたクリームパンダ (1 個約 35g) 中のメラミンの検出濃度で、濃度が高い検体 No.01 の 23.2mg/kg で試算した場合、体重 60kg の人で、FDA の TDI では、毎日 1.6kg (約 45 個)、EFSA の TDI では、毎日 1.3kg (約 37 個)、WHO の TDI では、毎日 0.5kg (約 14 個)、摂取した場合でも TDI に達することはない。

※TDI (耐用一日摂取量):ある汚染物等を、人が一生生涯にわたって毎日摂取し続けても、健康に悪影響がないと推定される一日あたりの摂取量。1 日あたり、ヒトの体重 1kg あたりの量で示される。

(4) その後の緊急立入調査で収去した検体のメラミンの検査について

2008 年 9 月末、京都市では、メラミンの混入が疑われる中国産加工食品が流通していると思われる、市内の百貨店や量販店に対して緊急立入調査を実施した。緊急立入調査で流通が確認できた中国産の乳等を主原料とする輸入食品 4 検体について収去し、当研究所でメラミンの検査を実施したが、メラミンは検出しなかった。

(5) 食品中シアヌル酸の分析の検討

シアヌル酸は、メラミンと同時に存在することで水素結合によりメラミンシアヌレート (図 10) の結晶を生じ、腎障害を起こすという、メラミンとの複合影響が考えられており、動物実験では、メラミンとシアヌル酸を同時に摂取した場合に毒性が増加することが示唆されている。FDA の暫定リスク評価では、メラミンとシアヌル酸等の複合影響に関する

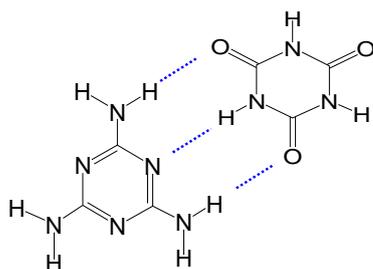


図10 メラミンシアヌレート

不確実を考慮した参照値として、 0.063mg/kg/体重/日 (メラミンの TDI を追加の安全係数 10 で割った値) が設定されている。このため、毒性面を考慮すれば、メラミンの検査を行う上でシアヌル酸も分析対象とすることが望ましいと考えられる。そこで、メラミンの検査の検討後、シアヌル酸の分析について検討した。市販のクリームパン、いか焼き、粉ミルクを使用し、シアヌル酸の添加回収試験 (n=3) を行った。前処理は、「2(4)試料の前処理」に従った。シアヌル酸 (表 2) は、トリアジン環の上に 3 つの水酸基をもつ酸性物質である (pKa=6.9) ため、50%アセトニトリル水溶液で抽出した抽出液を陰イオン交換カラム (MAX 500mg) を使用して精製し測定した。シアヌル酸の標準液を濃アンモニア水 (28%) で塩基性にした後、コンディショニング後の陰イオン交換カラム (MAX500mg) に負荷し、4%ギ酸-アセトニトリルで溶出分画を確認したところ 10mL までにシアヌル酸が溶出することが確認できたため、4%ギ酸-アセトニトリルによる溶出量を 10mL とした。

ア LC/MS によるシアヌル酸の分析の検討

LC/MS による分析は誘導体化の必要がないため、試料の前処理を簡素化でき、かつ高感度で選択性が高い利点がある。HPLC-PDA で用いたイオンペアクロマトグラフィーは、高濃度の緩衝液を使用するために、ESI には適用できず、メラミンやシアヌル酸のような親水性化合物の LC/MS による分析では、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography HILIC) を使用する手法⁽³⁾⁽⁴⁾が多く報告されている。シアヌル酸の LC/MS 分析にあたり、HILIC 用カラムでの分析を検討した。測定条件は表 8 のとおりである

図 11 に LC/MS 測定による検量線を示す。

$0.01\mu\text{g/mL}$ - $2\mu\text{g/mL}$ の範囲で標準系列を作成し、測定した結果、相関係数は 0.999 以上で直線性は良好であった。 $0.01\mu\text{g/mL}$ の標準も高い S/N 比で検出することができ、測定感度も良好であったが、実サンプルの測定では、マトリックスによるイオン化抑制効果でピーク強度が極端に低下する現象が見られた (図 12)。検討した条件では、定量が困難であると考えられたため、試験液を誘導体化し GC/MS 測定でシアヌル酸の定量を行うこととした。

表8 LC/MSによるシアヌル酸の分析条件

LC機器	Agilent HP-1100series
MS機器	LCQ DECA (thermo quest)
カラム	Inertsil HILIC(3mm×150mm,5 μm)
カラム温度	40℃
移動相	A/B=15/85 A: 10mM Ammonium acetate B: acetonitrile
流速	0.2mL/分
注入量	5μL
MS部	MS部
イオン化法	ESI
Spray Voltage	5kV
Capillary Temp	300℃
MS条件	negative c ESI Full ms [50.00-150.00]
MSMS条件	negative 128→(50-150) Collision energy 26.0% Q 0.250
¹³ C ¹⁵ N標識シアヌル酸	negative 134→(50-150) Collision energy 26.0% Q 0.250

cyanuric acid LC/MS (HILIC)

$$y = 16740372.274 x + 192786.568$$

$$R^2 = 0.999$$

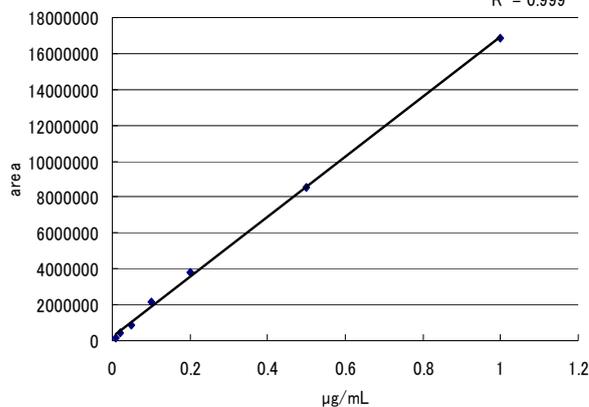
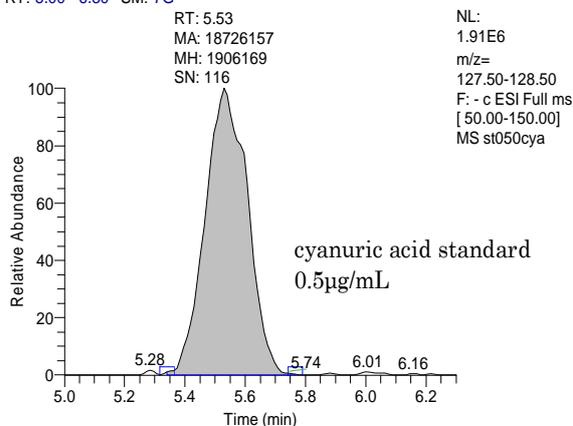


図11 cyanuric acid検量線0.01μg/mL-1μg/mL LC/MS

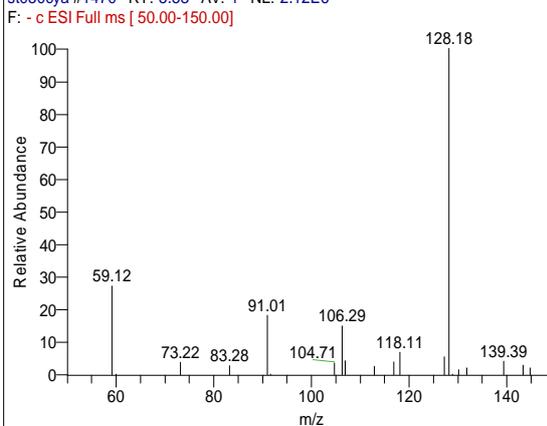
E:\data_el...\tenka3-DCM-1ggperml

2009/04/23 2:22:19

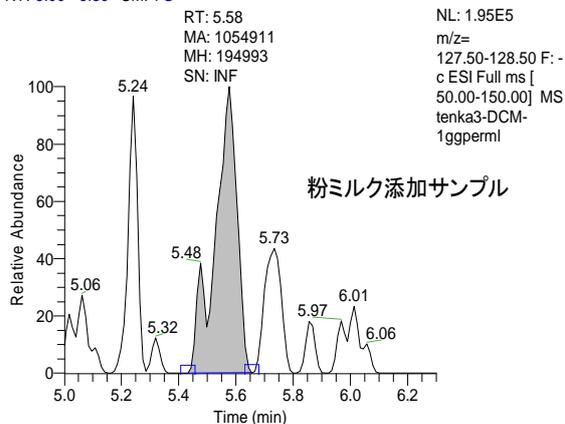
RT: 5.00 - 6.30 SM: 7G



st050cya #1470 RT: 5.53 AV: 1 NL: 2.12E6



RT: 5.00 - 6.30 SM: 7G



tenka3-DCM-1ggperml #1479 RT: 5.58 AV: 1 NL: 9.68E5

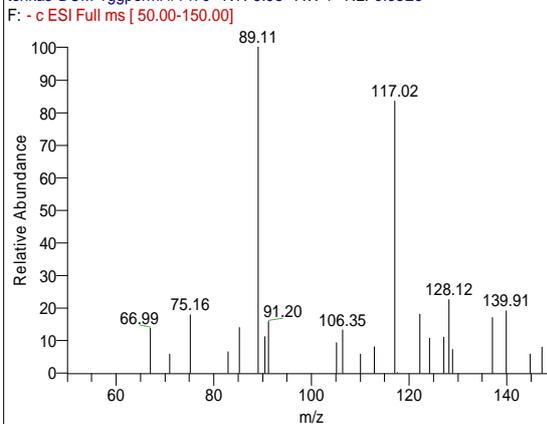


図12 粉ミルク添加シアヌル酸のLC/MSクロマトグラム及びMSスペクトル

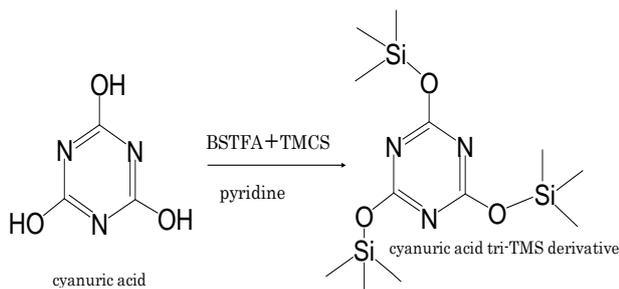


図13 シアヌル酸のTMS化

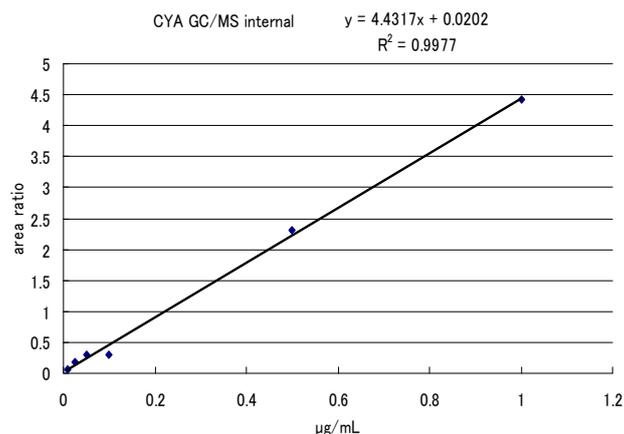


図14 cyanuric acid検量線 0.01 µg/mL-1 µg/mL GC/MS

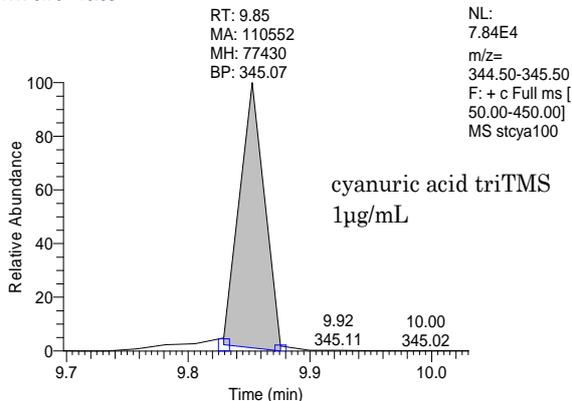
表9 シアヌル酸の添加回収試験結果 (n=3)

	回収率% (平均値)	標準偏差	%RSD
クリームパン	103.34	3.76	3.64
いか焼き	97.89	10.22	10.44
粉ミルク	86.77	8.45	9.74

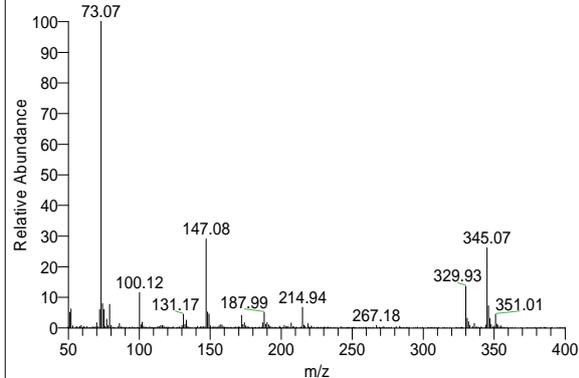
H:\data_hl...tenkacreampan005gperL-1

2009/05/08 17:22:33

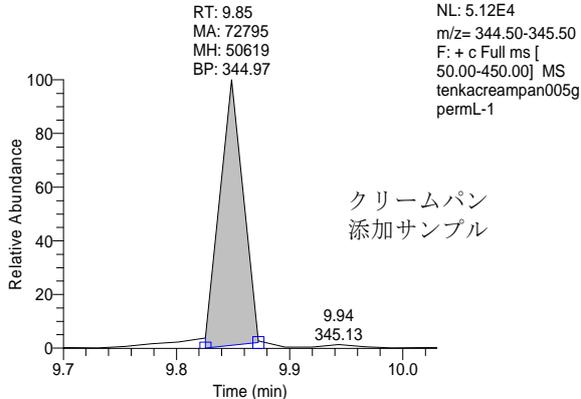
RT: 9.70 - 10.03



stcya100 #484 RT: 9.85 AV: 1 NL: 3.00E5
F: + c Full ms [50.00-450.00]



RT: 9.70 - 10.03



tenkacreampan005gperL-1 #487 RT: 9.85 AV: 1 NL: 2.30E5
F: + c Full ms [50.00-450.00]

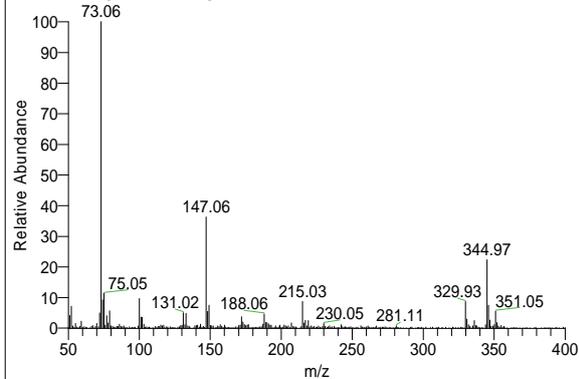


図15 クリームパン添加シアヌル酸のGC/MS SCAN測定クロマトグラム及びMSスペクトル

イ GC/MSによるシアヌル酸の分析の検討

陰イオン交換カラム(MAX 500mg)で精製後、4mLまで濃縮し、試料濃度(0.05g/mL)に調製した抽出液を500 μ L採取し、乾固後、ピリジン(脱水)300 μ L及びBSTFA-TMCS(99+1)200 μ Lを加えて70 $^{\circ}$ Cで45分加熱し、シアヌル酸の水酸基をトリメリルシリル化して(図13)GC/MSで測定した。GC/MSの測定条件は表5の通りである。メラミンの測定で、試験液の測定を繰り返すと、GC/MSのカラムやMS部が汚染され、測定感度が低下する現象が見られたため、シアヌル酸の検討では、メラミンよりも、サンプルを希釈した条件で誘導体化を行い、最終試験液中の試料濃度を0.05g/mLとした。内部標準物質として $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ 標識シアヌル酸を用い、内部標準法で検量線を作成し定量を行った。

0.01 μ g/mL–2 μ g/mLの範囲で検量線を作成し、測定(GC/MS-SCAN測定)した結果、相関係数は0.99以上で直線性は良好であった。(図14) 検量線の最小濃度0.01 μ g/mLの標準は、試料中濃度に換算して0.2 μ g/gに相当する。

表9にクリームパン、いか焼き、粉ミルクでのシアヌル酸のGC/MS測定での添加回収試験結果(n=3)を示す。シアヌル酸の添加濃度は10 μ g/gとし、 $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ 標識シアヌル酸の添加濃度は4 μ g/gとした。3種類いずれの検体でも、回収率70%以上120%以下、相対標準偏差20%以内の結果が得られた。

図15にクリームパンにシアヌル酸を添加したサンプルのGC/MS SCAN測定のクロマトグラム及びMSスペクトルを示す。

4 まとめ

- (1) 京都市内の2施設に残っていた、大阪府の食品メーカーの回収対象品「業務用クリームパンダ」2検体(No.01, No.02)についてメラミンの検査を実施した。50%アセトニトリルを酸性条件で抽出後、ジクロロメタンで脱脂、陽イオン交換カラムで精製して測定した。HPLC-PDA測定でメラミンの標準と一致するピークが得られたため、試験液を誘導体化しGC/MSで確認、定量したところメラミンの検出が確認できた。検査結果は、検体No.01は23.2mg/kg、検体No.02は4.6mg/kgであった。その後の立ち入り調査で収去した4検体についても検査を実施したがメラミンは検出しなかった。
- (2) シアヌル酸の分析について検討を行った。50%アセ

トニトリルで抽出後、陰イオン交換カラムで精製して測定した。LC/MSのHILICカラムを用いた分析では、標準の感度は良好であったが、添加サンプルでは、マトリックスによるイオン化抑制効果でピーク強度が極端に低下する現象が見られ、定量が困難であった。そのため、シアヌル酸についても、誘導体化を行いGC/MSで定量を行った。市販品を用いた添加回収試験では、回収率70%以上120%以下の、良好な結果が得られた。

今後、前処理条件やLC/MSでの測定条件を検討し、行政機関として必要時、確実な検査が実施できるよう、効率的な検査法を確立していきたいと考えている。

5 参考文献

- (1) “Updated FCC Developmental Melamine Quantification(HPLC-UV)”, April 2007
<http://www.fda.gov/cvm/melamine04022007.htm>
- (2) “GC/MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline and Cyanuric Acid”; U.S. Food and Drug Administration, Laboratory Information Bulletin LIB No.. 4423, Volume24, October2008
- (3) “Determination of Melamine Residues in Catfish Tissue by Triple Quadrupole LC-MS-MS with HILIC Chromatography” Laboratory Information Bulletin LIB No.. 4396, Volume23, May2007
- (4) “Interim Method for Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues in Foods using by LC-MS/MS:Version 1.0 Laboratory Information Bulletin, LIB No.. 4422, October2008