

大阪市内におけるメラミンに関する検査状況

山口之彦、宮本伊織、角谷直哉

Determination of Melamine Concentration in Imported Confectionery Products in Osaka City

Yukihiko YAMAGUCHI, Iori MIYAMOTO and Naoya KAKUTANI

Abstract

We investigated the concentration of melamine in 26 imported confectionery products. Melamine was detected in 3 biscuits and 1 candy. The concentration range of melamine is 0.5–11mg/kg and this range is same as the concentration range of melamine detected in Japan. The risk of melamine-related diseases is not high at this concentration as compared to the tolerable daily intake (TDI).

Key words: melamine, confectioneries, LC/MS/MS

I はじめに

中国は2008年9月に、メラミンが混入された牛乳より製造した幼児用粉乳による健康被害が生じたことを公表した[1]。これ以前に2007年3月に北米でメラミンが混入したペットフードでペットに腎障害が発生している[2]。この場合は、中国製小麦グルテンへのメラミン混入であった。中国での公表以降、メラミンが混入したと思われる牛乳を用いて加工した製品が商社を通じて日本にも輸入されていることが明らかとなった。それを受けて、9月の末にメラミンが検出された商品を丸大食品が自主回収を行った[3]。その後もメラミン混入が疑われる商品について、各地の分析機関で検査が行われ、いくつかの輸入菓子、輸入冷凍たこ焼き、輸入冷凍ピザ生地などから検出された[4,5]。

当研究所においても、メラミンの混入が疑われる商品について、検査を行った。その際の検査方法、検査結果について報告する。

II 実験方法

1) 試料

メラミン混入の可能性のあるクリームをはさんだビスケット、クラッカーおよびウエハースなどのビスケット類24試料、ポテトチップスなどのスナック類1試料およびあめ

などのキャンデー類1試料であった。試料の概要は、表1に示す。

2) 試薬

メラミンは和光純薬より入手し、1000 μ g/mLの水溶液を作成し、標準原液とした。これを適宜希釈して使用した。検量線用の標準溶液は、0.005~0.1 μ g/mLの範囲で4点作成した。

$^{15}\text{N}_3$ -メラミンは大阪府立公衆衛生研究所より10 μ g/mL溶液を入手した。

PSAカラムカートリッジは、スペルコより500mg入り入手した。

3) 装置

高速液体クロマトグラフータンデム質量分析計 (LC/MS/MS)

高速液体クロマトグラフ: Agilent LC1100

タンデム質量分析計: Applied Biosystems API2000

LCカラム: Atlantis HILICシリカカラム (2.1 mm \times 150 mm, 5 μ m)

移動相: A液-アセトニトリル B液-20 mM酢酸アンモニウム水溶液

A/B 95/5(1分)-5/95(5分)-95/5(4分)

流量: 0.2 mL /分

カラム温度:30°C、イオン源:ESI
 イオンスプレー電圧:4800V
 イオン源温度:550°C、測定モード:MRM
 モニターイオン:メラミン-m/z 127 → m/z 85
 (定量用)、m/z 68、m/z 43 (確認用)
¹⁵N₃-メラミン-m/z 130 → m/z 87

4) 試料の調製[6,7]

(1) ビスケット類、スナック類

ミルサーで均一にした試料1gを50 mLの遠沈管に採取し、10 μg/mLの¹⁵N₃-メラミンを200 μLおよび精製水:アセトニトリル(1:1)を25 mL加え、30分間振とう抽出した。その後、2000 rpmで5分間遠心分離を行い、上澄み液を2 mL分取した後、アセトニトリルを加え8 mLとした。あらかじめ、メタノール5 mL、精製水:アセトニトリル(1:1) 5 mLでコンディショニングしたPSAカラムカートリッジに、先に8 mLに調整した抽出液のうち5 mLを負荷した。PSAカラムカートリッジから精製水:アセトニトリル(1:1) 1 mLでメラミンを溶出させ、精製水:アセトニトリル(1:1)を加え10 mLとした。溶出液をPTFEの0.45 μmのフィルターでろ過し、LC/MS/MSによるメラミンの測定を行った。

(2) あめ類

試料1gをビーカーに取り、10 μg/mLの¹⁵N₃-メラミンを200 μLおよび40°Cに加温した精製水50 mLを加え、試料を溶解した。その後、アセトニトリル50 mLを加え、混合し、精製水:アセトニトリル(1:1)の試料液を調製した。試料液5 mLを分取し、その後は、(1)と同様に、PSAカラムカートリッジによる精製以降の操作を行った。

5) 定量および定性

LC/MS/MSによる定量は、¹⁵N₃-メラミンとメラミンのピーク面積値の比を縦軸とし、濃度を横軸にとった検量線をもとに行った。¹⁵N₃-メラミンのm/zは130→87を用い、メラミンはm/z 127→85、68、43の3つのイオンを用いた。それぞれのイオンで検量線を作成し、定量した。これらの定量値の平均から±20%以内に収まっている場合は、メラミンが検出されたと定性的に判断した。

6) 添加回収試験

添加回収試験は、試料の中でメラミンが検出されなかったビスケット類4種(試料No.5, 6, 8, 22)について3回の繰り返し試験を行った。また、キャンデー類については試料から検出されたため、市販のミルクキャンデー

表1 試料の概要

試料番号	試料名	収去日	賞味期限
1	ポテトチップス濃厚わさび醤油味	2008.10.3	2009.3.30
2	コーンチュールチョコレートクリーム	2008.10.3	2009.5.22
3	チップスコーン	2008.10.3	2009.1.13
4	チップスコーン	2008.10.3	2009.1.31
5	Kittyland	2008.10.6	2009.4
6	クラッツ半製品	2008.10.6	2008.6.25
7	ミルクソフトキャンディー	2008.10.7	2009.8.12
8	プレーンビスケット	2008.10.7	2009.7.26
9	ストロベリークリスプ	2008.10.10	2009.9.4
10	レモンクリスプ	2008.10.10	2009.8.12
11	ピーナッツクリスプ	2008.10.10	2009.7.25
12	クリームサンドクラッカーミルク	2008.10.10	2009.7.19
13	クリームサンドクラッカーチョコレート	2008.10.10	2009.7.25
14	スティクウエハース ストロベリー	2008.11.14	2009.10.6
15	スティクウエハース ストロベリー	2008.11.14	2009.9.22
16	スティクウエハース ストロベリー	2008.11.14	2009.9.8
17	スティクウエハース チョコレート	2008.11.14	2009.10.13
18	スティクウエハース チョコレート	2008.11.14	2009.10.6
19	スティクウエハース チョコレート	2008.11.14	2009.9.22
20	スティクウエハース バニラ	2008.11.14	2009.9.22
21	プチクリームロール ストロベリー	2008.11.14	2009.8.4
22	バニラクリームクラッカー	2009.11.20	2009.9.29
23	バニラクリームクラッカー	2009.11.20	2009.10.20
24	バニラクリームクラッカー	2009.11.20	2009.10.22
25	チョコクリームクラッカー	2009.11.20	2009.10.1
26	チーズクリームクラッカー	2009.11.20	2009.10.8

表2 LC/MS/MSの最適条件

物質名	電荷	プレカーサーイオン(Q1)	プロダクトイオン(Q3)	CE
メラミン	+	127	85	25
			68	41
			43	47
¹⁵ N ₃ -メラミン	+	130	87	27
			44	49
			69	41

を購入して添加回収試験に供した。ビスケット類と同様に3回の繰り返し試験を行った。

III 結果および考察

1) LC/MS/MSの最適化

メラミン、¹⁵N₃-メラミンをLC/MS/MSで測定するために、測定条件の最適化を行った。それぞれ、10 μg/mLの水溶液を作成し、MS/MSに導入し、装置付属のソフトウエアで最適化を行った。イオンモードは正イオンおよび負イオンの両方でを行い、感度のよい方を採用した。最適化の結果として電荷、プレカーサーイオン(Q1)、プロダクトイオン(Q3)、コリジョンエネルギー(CE)を表2に示す。

Q1はメラミン、¹⁵N₃-メラミンともに[M-H]⁺であった。生

成するQ3として感度の高いものからメラミンでは3つのイオンを、 $^{15}\text{N}_3$ -メラミンは感度の一番高いイオンを採用した。この最適条件を用いて、メラミン、 $^{15}\text{N}_3$ -メラミンともに0.1 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液をLC/MS/MSで測定を行った際のクロマトグラムを図1に示す。ここに示すようにメラミン、 $^{15}\text{N}_3$ -メラミンともに同じ保持時間で溶出した。同じ濃度であるが、メラミンが $^{15}\text{N}_3$ -メラミンの約1/3の感度であった。メラミンは、0.005 $\mu\text{g/mL}$ の濃度においてもS/N比は10以上であり、高感度での測定が可能であった。

2) 添加回収試験

添加回収試験の結果を表3に示す。得られた添加回収率および相対標準偏差は、測定したイオンによって様相が異なった。m/z 85および63の平均回収率はほぼ100%、相対標準偏差はほぼ10%以内であった。それに

対して、m/z 43では、平均回収率で81~174%、相対標準偏差で16.2~34.8%と大きくばらついていた。質量数が低いためと考えられるが、実際の定量には不適と考え、実試料の定量はm/z 85および63を用いて行った。

本分析法は、試料の抽出時に測定する化学物質の安定同位体を添加する同位体希釈法を用いている。この方法は、使用した安定同位体が、測定する化学物質と分析上ほぼ同じ回収率を示すことを前提に成り立つ方法で、補正により正しい測定値が得られるメリットがある。今回、この方法を用いた理由がもう1つある。実際の回収率が悪い場合においても、十分な見かけの回収率をとれるためである。ちなみにこの分析法において、同位体を用いずに定量を行うと、回収率は約20%であった。

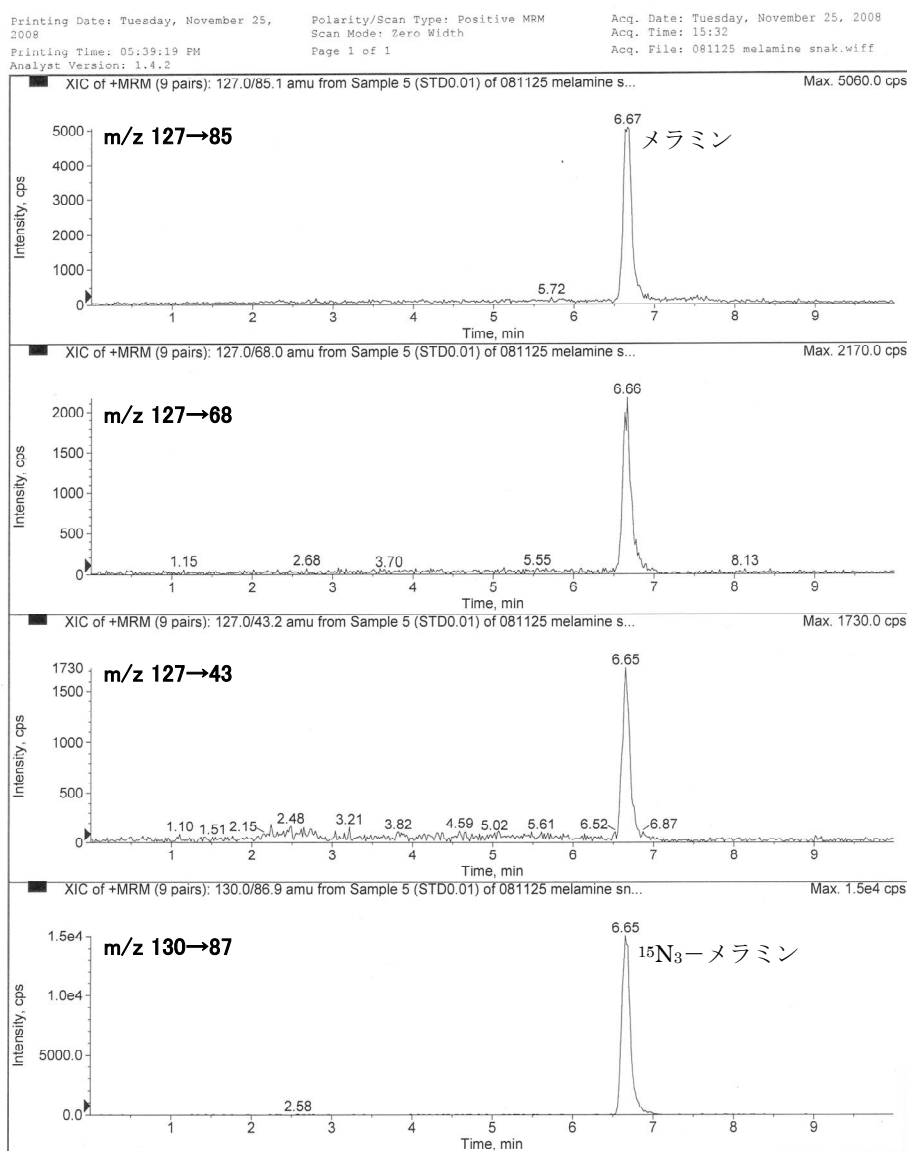


図1 メラミン標準溶液(0.01 $\mu\text{g/mL}$)のMRMクロマトグラム

表3 回収試験結果

試料番号	質量数	回収率, %				
		1	2	3	平均	CV%
5	85	105.9	114.3	104.4	108.2	4.9
	68	104.0	98.2	114.9	105.7	8.0
	43	62.8	114.0	67.5	81.4	34.8
6	85	110.7	114.4	98.2	107.8	7.8
	68	100.3	114.6	79.0	98.0	12.3
	43	127.9	189.6	203.0	173.5	23.0
8	85	94.5	98.4	101.3	98.1	3.4
	68	98.0	98.6	93.5	96.7	2.8
	43	97.6	101.8	130.2	109.9	16.2
22	85	97.4	98.0	99.2	98.2	0.97
	68	95.5	94.3	97.6	95.8	1.7
	43	107.9	102.6	99.3	103.3	4.2
ミルク キャンデー	85	101.1	120.5	103.3	108.3	9.8
	68	96.2	118.7	104.8	106.6	10.6
	43	84.4	110.5	74.6	89.8	20.6

3) 試料中濃度

26試料について分析を行い、4試料についてメラミンを検出した。結果を表4に示す。メラミンが検出された試料No.26のマスプロトグラムを図2に示す。

試料No.2は2.1 mg/kg検出されているが、これは定量イオンであるm/z 85の定量値を採用している。確認イオンm/z 68の定量値も2.1 mg/kgであり、同濃度であった。この結果は、5) 定量および定性の項で示した定性基準である±20%以内であることから、試料No.2においてメラミンは検出されたものと考えた。他の検出された試料についても同様の結果が得られ、メラミンが検出されたものとした。

メラミンの検出濃度は、0.5～11 mg/kgの範囲であった。わが国において、最初にメラミンが検出された丸大食品の商品中のメラミン濃度が、0.8～37 mg/kgであったこと、また、混入が疑われる商品から検出され、厚生労働省へ報告されたメラミンの濃度範囲が、0.5～54 mg/kgであったことから考える[4,5]と、今回の結果は、妥当であるといえる。また、わが国に入ってきたメラミン混入の商品中の濃度は、およそこのレベルであるといえる。

これらの検出レベルにおける安全性を欧州食品安全機関(EFSA)の耐容1日摂取量(TDI)である0.5 mg/kg体重/日を用いて計算を試みた[8]。体重60 kgの人が1日当たり許容できるメラミンの摂取量は0.5×60で30 mgとなる。わが国で報告されている中で54 mg/kgの商品で、1日550 gを毎日摂取して許容摂取量の30 mgとなる。成人日本人の1日に摂取する菓子は平成19年の調査で26.3gであり[9]、ここで算出した550gの摂取量は通常の約20倍を摂取することになる。このことから、

表4 試料中の濃度

試料番号	濃度, mg/kg	試料番号	濃度, mg/kg
1	0.5	14	N.D.
2	2.1	15	N.D.
3	N.D.	16	N.D.
4	N.D.	17	N.D.
5	N.D.	18	N.D.
6	N.D.	19	N.D.
7	11	20	N.D.
8	N.D.	21	N.D.
9	N.D.	22	N.D.
10	N.D.	23	N.D.
11	N.D.	24	N.D.
12	N.D.	25	N.D.
13	N.D.	26	9.2

N.D. : 0.5mg/kg

今回検出されたメラミン濃度においては、大きなリスクはないものと考えられる。

IV 結論

メラミンの混入が疑われた26の菓子類について、メラミンの分析を行った。4つの菓子類にメラミンが検出され、濃度範囲は0.5～11 mg/kgであった。他の分析機関で行った検査において、メラミンは0.5～54 mg/kgの濃度範囲であったことから、当研究所で行った検査は妥当であると考えられた。また、EFSAのTDIを元に許容摂取量を計算したところ、大きなリスクはないものと考えられた。

謝辞 ¹⁵N₃-メラミンを分けていただいた大阪府立公衆衛生研究所、食品化学課の皆様に深く感謝いたします。

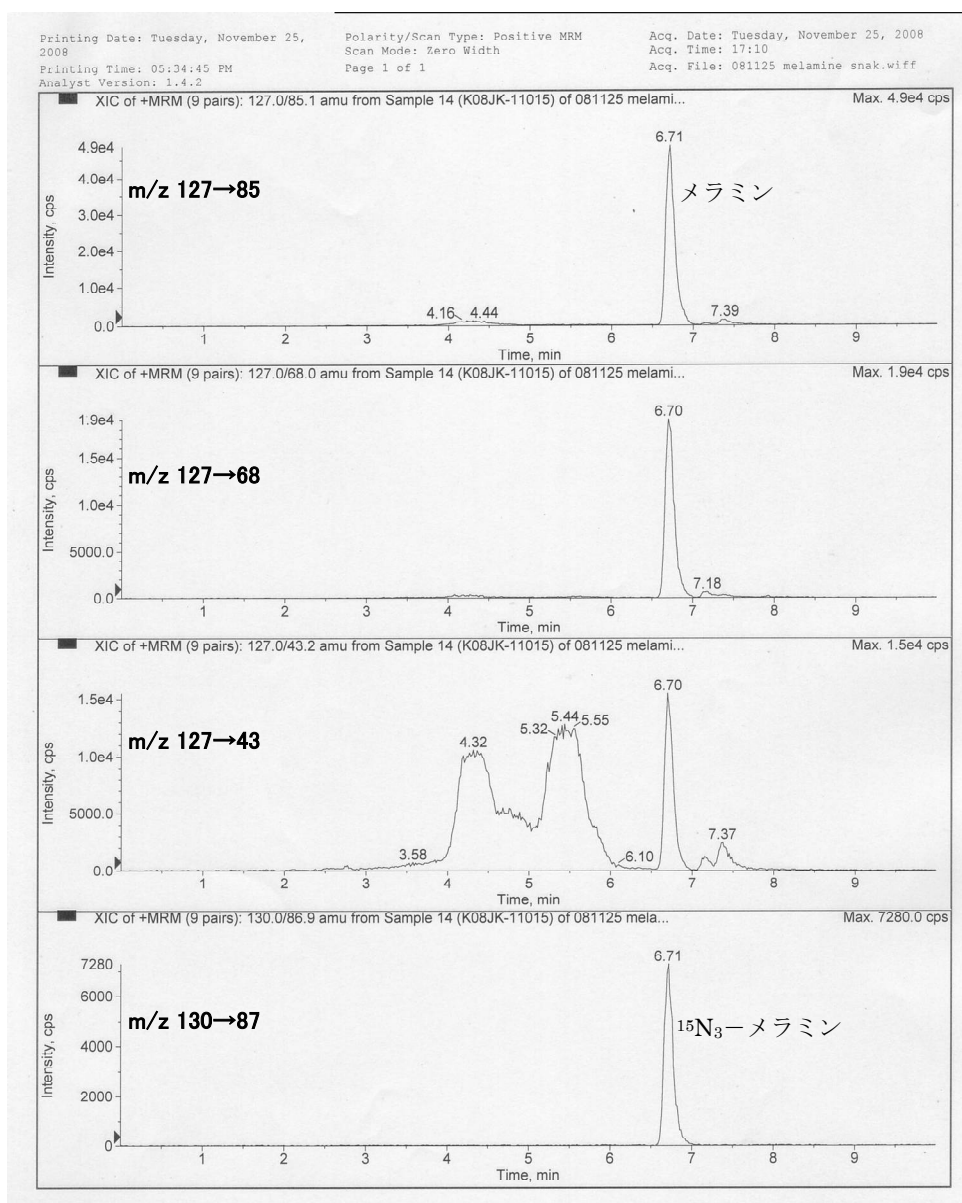


図 2 試料 No.26 の MRM クロマトグラム

参考文献

- 1) 東京新聞. 2008.9.25記事
- 2) 松本 理. メラミンによるペットの急性腎障害の原因はシアヌル酸との共結晶であった. ファルマシア 2009; 45: 469-471
- 3) 厚生労働省. 中国における牛乳へのメラミン混入事案への対応について(第3報). 報道発表資料平成20年9月26日 (2008)
- 4) 厚生労働省. 中国における牛乳へのメラミン混入事案への対応について(第9報). 報道発表資料平成20年10月10日 (2008)
- 5) 厚生労働省. 中国における牛乳へのメラミン混入事案への対応について(第17報). 報道発表資料平成20年11月4日 (2008)
- 6) A New, Fast and Sensitive LC/MS/MS Method for the Accurate Quantitation and Confirmation of Melamine and Cyanuric Acid in Pet Food Samples. Applid Biosystems, Application Note (2007)
- 7) 厚生労働省. 食品中のメラミン試験法について. 食安監発第1002002号. 平成20年10月2日(2008)
- 8) 欧州食品安全機関. 中国における乳幼児用調製粉乳及び他の乳製品中のメラミンによる公衆衛生リスクに関する声明 (2008年9月).
- 9) 厚生労働省. 平成19年国民健康・栄養調査結果の概要 (2008年12月).