

## 輸入菓子中のメラミンの分析法の検討

角谷直哉、村上太郎、山口之彦、清水充

## Analysis of Melamine in Imported Confectionery Products

Naoya KAKUTANI, Taro MURAKAMI, Yukihiko YAMAGUCHI and Mituru SHIMIZU

## Abstract

We developed a method for determination of melamine in confectionery products using two kinds of stable isotopes, melamine- $^{15}\text{N}_3$  as internal standard, and melamine- $^{13}\text{C}_3\cdot^{15}\text{N}_3$  as syringe spike. The recovery rates and standard deviations (SD) of fortified authentic melamine were 90-94% and 0.8-1.0%, respectively. The average recovery ( $\pm$ SD) of melamine- $^{15}\text{N}_3$  estimated with melamine- $^{13}\text{C}_3\cdot^{15}\text{N}_3$  was  $105 \pm 2.7\%$  for the forty imported confectionery products. It is possible to determine melamine contents and its recoveries at the same time by using two stable isotopes.

**Key words:** Melamine, Liquid Chromatograph Coupled with Tandem Mass Spectrometer, Internal Standard, Imported Dairy Products

## I 緒言

メラミン(1,3,5-トリアジン-2,4,6-トリアミン)は、大部分がメラミン樹脂の原料として工業的に使用される有機化合物である。メラミン樹脂は耐衝撃性、耐水性、耐摩耗性に優れ日用品や食器に多く利用されている。

2007 年にカナダのペットフードメーカーが製造したペットフードを食べたイヌやネコが死亡する事件が発生し、原因物質が原料中のメラミン及びその類縁物質であることがわかった[1]。メラミンを混入させた理由は、食品中のタンパク質は含窒素量を指標として測定するため、分子量の約 7 割を窒素が占める含窒素量が高いメラミンを混入させる事によって、見かけ上タンパク質含量を高く見せるためだと考えられている。

2008 年に中国においてメラミンが混入された乳児用粉ミルクを摂取した乳児が腎臓障害を起こしたことが報告された[2]。その後、メラミンの混入は粉ミルクのみならず菓子類などの乳製品におよぶことが明らかとなり、アジア、ヨーロッパを始め世界各国に影響が拡大した。

当所においても 2008 年 10 月から 12 月にかけてメラミンの混入が疑われる輸入菓子 26 検体について検査を行った[3]。また、2009 年度から収去検査として年間 40 検体の輸入菓子の検査を行っている。

既報[3]では安定同位体であるメラミン- $^{15}\text{N}_3$  を内部標準物質として検体に添加してメラミンの分析を行い、添加回収試験は 2~3 検体について 5 回繰り返しで行った。従って、メラミンの回収率が求められるのは、添加回収を行った検体のみであった。本報では、メラミン- $^{13}\text{C}_3\cdot^{15}\text{N}_3$  を

機器分析前の試料にシリンジススパイクとして添加し、全ての検体についてメラミン- $^{15}\text{N}_3$  の回収率を求めた結果について報告する。

## II 方法

## 1) 試料

試料は 2012 年度に収去された輸入菓子類 40 検体である。検体の内訳は、ウエハースが 8 種類、クッキーが 5 種類、チョコレート菓子が 12 種類、ビスケットが 7 種類、ワッフルなどの焼き菓子が 2 種類、ケーキなどの洋菓子が 6 種類であった。

## 2) 試薬

メラミン標準原液(1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )は関東化学(株)製を、メラミン- $^{15}\text{N}_3$ (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )は Dr. Ehrenstorfer GmbH 製を、メラミン- $^{13}\text{C}_3\cdot^{15}\text{N}_3$ (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )は Cambridge Isotope Laboratories, Inc 製を用いた。検量線は、メラミン標準原液を希釈し 0.0025~0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲で作成した。

アセトニトリル、メタノールおよび蒸留水は HPLC 用を用いた。酢酸アンモニウムは和光純薬(株)製高速液体クロマトグラフ用を用いた。

PTFE フィルターは ADVANTEC 製 DISMIC (13mm $\phi$ , 0.45  $\mu\text{m}$ )を用いた。PSA 固相カートリッジ(500 mg)はスペルコ製を用いた。

## 3) 装置および測定条件

測定には高速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。

(1) HPLC 条件

装置: Acquity(Waters 社製)  
 カラム: Inertsil HILIC(2.1×150 mm, 粒径 5 μm  
 GL サイエンス製 )  
 カラム温度: 40°C  
 移動相: A 液 アセトニトリル  
 B 液 20 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液  
 A/B 50/50(3 分)-20/80(6 分)-50/50(9 分)  
 流速: 0.4 mL/min  
 注入量: 10 μL

(2) MS/MS 条件

装置: Xevo TQ (Waters 社製)  
 イオン化モード: ESI(+)  
 脱溶媒ガス温度: 400°C  
 脱溶媒流量: 800 L/hr  
 測定モード: MRM

化合物ごとの条件を表 1 に示した。各化合物の上段が定量用イオン、下段が確認用イオンの条件である。

表 1 分析条件

Compound	Transition (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
melamine	126.9>84.9	31	17
	126.9>67.9	31	22
melamine - <sup>15</sup> N <sub>3</sub>	129.7>86.9	29	17
	129.7>43.9	29	22
melamine - <sup>13</sup> C <sub>3</sub> • <sup>15</sup> N <sub>3</sub>	132.5>89.0	34	18
	132.5>71.0	34	22

4) 試料の調製

試料は、既報および厚生労働省の通知に従い抽出および精製を行った[3][4]。ブレンダーあるいはミルサーで均一化した試料 1g を 50 mL の遠沈管に採取し、メラミン-<sup>15</sup>N<sub>3</sub> を 2 μg 添加した。アセトニトリル:精製水(1:1) 25 mL 加え 30 分間振とう抽出し、3000 rpm で 5 分遠心分離を行った。上澄み液 2 mL を試験管に採り、アセトニトリル:精製水(1:1) 6 mL を加えて希釈した。予め、メタノールおよびアセトニトリル:精製水(1:1)各 5mL でコンディショニングした PSA カラムに 5 mL の希釈液を負荷し、アセトニトリル:精製水(1:1) 1 mL で溶出させた。溶出液を 10 mL に定容し 1 mL を試験管に分取してメラミン-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>•<sup>15</sup>N<sub>3</sub> を 10 ng 添加し、PTFE フィルターでろ過し LC-MS/MS により測定を行った。

5) 定量および定性

メラミンと内部標準物質であるメラミン-<sup>15</sup>N<sub>3</sub> の相対濃度と相対強度から検量線を作成し定量計算を行った。標準液における定量用イオンと確認用イオンの比率の 20%

以内を定性の条件とした。

メラミン-<sup>15</sup>N<sub>3</sub> の濃度は、メラミン-<sup>15</sup>N<sub>3</sub> のメラミン-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>•<sup>15</sup>N<sub>3</sub> に対する相対感度を算出して求めた。

6) 添加回収試験

添加回収試験は、メラミンが検出されなかったブランク試料のウエハースおよびチョコレートにメラミンを 2 μg 添加し、5 回の繰り返し試験を行った。

III 結果及び考察

1) 輸入菓子中のメラミン濃度

LC-MS/MS により測定したメラミン標準液(0.01 μg/mL)の MRM クロマトグラムを図 1 に示した。メラミンの定量下限は、検量線の最も低い濃度(0.0025 μg/mL)と試料調製時の希釈率(200 倍)から、試料中濃度として 0.5 μg/g とした。

検査を行った 40 検体の全ての試料において、メラミン濃度は定量下限以下であった。

乳製品への混入事件が発生した 2008 年から 2009 年にかけての調査ではメラミンが検出された例が報告されている。藤田らは加工食品中から 0.8~37 μg/g のメラミンを検出し[5]、西村らはクリームまんから 1.5~2.2 μg/g のメラミンを検出している[6]。当所においても、2008 年度に検査した 26 検体中 3 検体から 0.5~11 μg/g でメラミンが検出された。しかし、2009 年度以降に実施している収去検査ではメラミンが検出された事例は無かった。

2) 添加回収試験

ウエハースおよびチョコレートの 2 試料で添加回収試験を行った。ウエハースでの平均回収率は 94%、相対標準偏差は 1.0%、チョコレートでは平均回収率は 90%、相対標準偏差は 0.8%であり良好な結果であり、本法がメラミンの分析法として妥当であることがわかった。

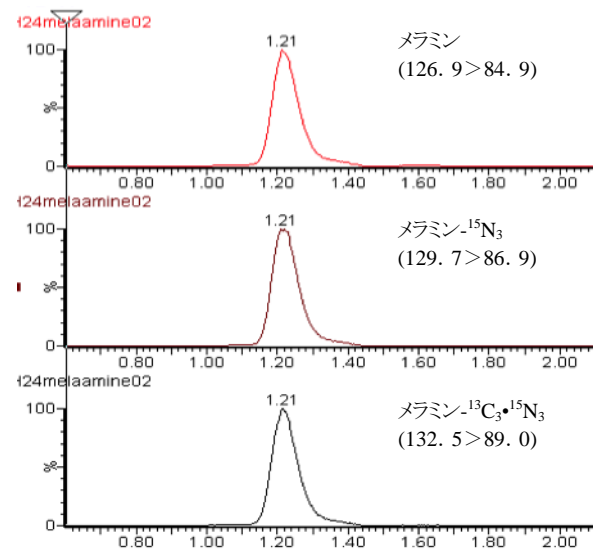


図 1 メラミン標準溶液(0.01 μg/mL)の MRM クロマトグラム

3) マトリックスの影響

食品試料を LC-MS/MS で分析する際には、精製を行っても取り除くことができない試料由来のマトリックスに影響を受けることが多い。本法において精製は PSA カラムを使用した。これにより脂肪酸はある程度除去されると考えられるが、その他の糖類などのマトリックスは測定試料中に残っていると考えられる。これらマトリックスの影響を調べるために、標準液中のメラミン- $^{15}\text{N}_3$  のピーク面積と、輸入菓子試料のメラミン- $^{15}\text{N}_3$  ピーク面積の絶対値の比較を行った(図 2)。検量線に用いた 5 点のメラミン標準液中のメラミン- $^{15}\text{N}_3$  のピーク面積の平均は  $1.87 \times 10^5$  であり、これを図中に黒線で示した。棒グラフは 40 検体中のメラミン- $^{15}\text{N}_3$  ピーク面積の絶対値である。メラミン- $^{15}\text{N}_3$  の濃度は標準液、輸入菓子試料とも同じで、 $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$  である。

添加回収試験の結果メラミンの回収率は 90% 以上の良好な結果が得られたことから、試料中のメラミン- $^{15}\text{N}_3$  の面積が標準液に比べて低い原因は前処理時のロスではなく、マトリックスの影響を受けているためであると考えられる。図 2 からわかるように全ての試料においてイオン化抑制(サプレッション)の影響を受けていることがうかがえた。サプレッションの度合いは試料により異なるが、標準液に対して 50% 以上の抑制を受けているものがほとんどであった。

輸入菓子の種類別に見ると、チョコレート菓子がサブ

レクションの影響が最も大きく、標準液に対して平均 80.2% の抑制を受けており、続いてウエハースが 79.9%、洋菓子が 75.1%、ビスケットが 68.8%、焼菓子が 61.6%、クッキーが 56.6% の順であった。

4) メラミン- $^{15}\text{N}_3$  の回収率

標準液におけるメラミン- $^{15}\text{N}_3$  のメラミン- $^{13}\text{C}_3 \cdot ^{15}\text{N}_3$  に対する相対感度から濃度を求めて、メラミン- $^{15}\text{N}_3$  の回収率を算出した(図 3)。40 検体の平均回収率は 105%、相対標準偏差は 2.7% と良好な結果であった。

図 2 に示したように、LC-MS/MS の測定時に受けるサプレッションの影響は試料により大きく異なっている。しかし、図 1 から分かるようにメラミン、メラミン- $^{15}\text{N}_3$  およびメラミン- $^{13}\text{C}_3 \cdot ^{15}\text{N}_3$  のリテンションタイムは同じであるため、同一の試料でそれぞれのメラミンが受けるサプレッションの影響は同じであると考えられる。従って、内部標準物質のメラミン- $^{15}\text{N}_3$  の濃度をシリンジスパイクとして添加したメラミン- $^{13}\text{C}_3 \cdot ^{15}\text{N}_3$  を用いて算出することにより、マトリックスの影響を考慮した正確な回収率を求めることができる。

検体数が多い場合は全ての検体で添加回収試験を行うことは不可能であるが、2 種類の安定同位体を用いることにより全ての検体での回収率を求めることが可能であることがわかった。

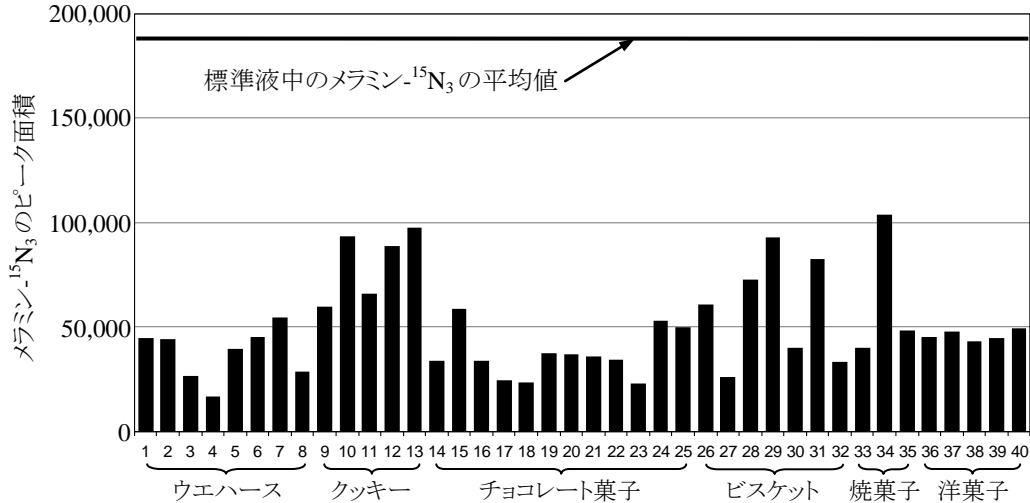


図 2 マトリックスによるイオン化の影響

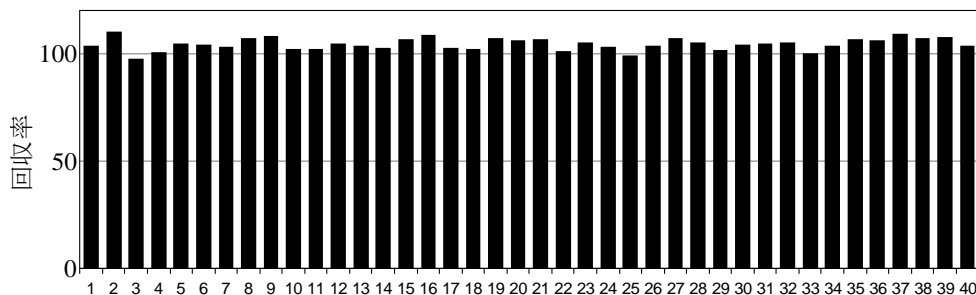


図 3 メラミン- $^{15}\text{N}_3$  の回収率

#### IV まとめ

菓子類中のメラミンの分析を2種類の安定同位体を用いて分析を行った。添加回収試験の結果は平均回収率90~94%、相対標準偏差0.8~1.0%と良好であり、本法が分析法として妥当であることが確かめられた。シリンジスパイクのメラミン- $^{13}\text{C}_3\cdot^{15}\text{N}_3$ を用いて内部標準物質のメラミン- $^{15}\text{N}_3$ の回収率を求めた結果、平均回収率は105%、相対標準偏差は2.7%であり、検体数が多い場合でも2種類の安定同位体を用いることにより全ての検体での回収率を求めることが可能であった。

#### 参考文献

- 1) 山本 都, 畝山智香子, 登田美桜, 佐々木史歩, 森川 肇. 米国におけるペットフードや動物飼料のメラミン汚染. 食品衛生学雑誌 2008 ; 49 : J13-J16.
- 2) 登田美桜, 山本 都, 畝山智香子, 森川 肇. 中国における乳及び乳製品のメラミン汚染. 食品衛生学雑誌 2009 ; 50 : J231-J235.
- 3) 山口之彦, 宮本伊織, 角谷直哉. 大阪市内におけるメラミンの検査状況. 大阪市立環境科学研究所報告 2009 ; 71 : 15-19.
- 4) 厚生労働省. 食品のメラミンの試験法について. 食安監発第1002002号, 平成20年10月2日.
- 5) 藤田瑞香, 柿本健作, 永吉晴奈, 小西良昌, 内田耕太郎, 小阪田正和, 他. 中国製加工食品中のメラミンの分析. 食品衛生学雑誌 2009 ; 50 : 131-134.
- 6) 西村政則, 前田大史郎, 吉川英一. 食品中ノメラミンおよびシアヌル酸の分析について. 滋賀県衛生科学センター所報 2009 ; 44 : 55-58.