

ノート

食品中のメラミンおよび関連化合物分析法の検討

川合啓之, 林 克弘, 竹内 浩, 一色 博,
林崎由美子, 大垣有紀, 志村恭子

Examination of Determination of Melamine and Related Compounds in Foods

Hiroyuki KAWAI, Katsuhiko HAYASHI, Hiroshi TAKEUCHI, Hiroshi ISSHIKI,
Yumiko HAYASHIZAKI, Yuki OHGAKI, and Kyoko SHIMURA

2008 年, 中国において粉ミルクへのメラミン混入事件が発生した. メラミンは食器などに利用されるメラミン樹脂の原料であり, 食品中に混入することは想定されていないことから, 食品を対象とした分析法は確立されていなかった. その後, 厚生労働省から通知法として「メラミン試験法」が示されたが, その関連化合物であるアンメリンおよびアンメリドについては現在まで示されていない. そこで, 本報では当該通知法がアンメリンおよびアンメリドの分析法として適用可能であるか確認するために, 食品 12 種について標準添加回収実験を実施した. その結果, マトリックス検量線を用いて定量を行うことにより, 良好な回収率を得ることができた. また, 通知法による分析が困難な食品については, 試料採取量を変更することで, 対応が可能となった.

キーワード: メラミン, アンメリン, アンメリド, マトリックス検量線, LC/MS/MS

はじめに

2007 年 3 月, 米国でメラミンが混入されたペットフードを食べた犬や猫が死亡する事件が発生した¹⁾. また, 2008 年 9 月には, 中国でメラミンが混入された粉ミルクを飲んだ乳幼児が, 腎結石等を発症する事件が発生した²⁾. これらの事件は, いずれも中国国内において牛乳等のタンパク質含量を偽装するため, 故意にメラミンが混入されたことが原因であった. その後の調査で, メラミンは家畜の飼料にも混入されていた事実が判明し, 飼料から豚肉, 鶏卵等への移行が懸念された. 国内でも, 中国産の乳製品を原料とした菓子などから, メラミンが相次いで検出された.

メラミンはその製造過程において, 図 1 のようなアンメリン, アンメリドおよびシアヌル酸の 3 化合物を副生成物として生成する³⁾. 特にシアヌル酸はメラミンと反応してメラミンシアヌレートを生じ, 健康被害を起こす原因物質とされている⁴⁾. しかし, これらの化合物の分析法となると, 通知法^{5,6)}は分析対象化合物をメラミンに限

定しており, さらにメラミンおよびシアヌル酸以外の分析法については報告例が少ない^{7~9)}. そこで, 本報では, アンメリンおよびアンメリドの分析法として, 当該通知法の適用が可能であるか検討したところ, 良好な結果が得られたので報告する.

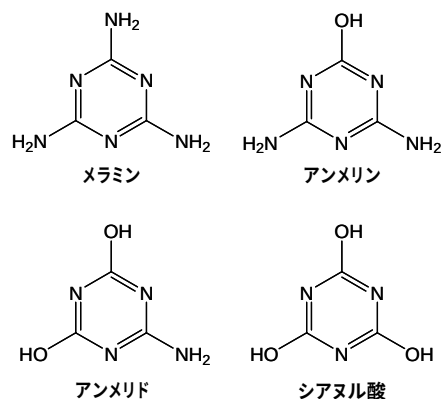


図 1 メラミンおよび関連化合物

実験方法

1. 試料

市販されている表1に示した食品12種を用いた。

2. 試薬

1) メラミンおよび関連化合物標準品

メラミン、アンメリンおよびアンメリドは、和光純薬工業(株)製食品分析用標準品を使用した。

メラミン内標準($^{13}\text{C}_3\cdot^{15}\text{N}_3$)は、Cambridge Isotope Laboratories 社製標準品(100 $\mu\text{g/mL}$ 溶液)を使用した。

2) 溶媒

蒸留水、アセトニトリルおよびメタノールは、関東化学(株)製 LC/MS 用を使用した。

3) その他の試薬

アンモニアは和光純薬工業(株)製試薬特級、塩酸は和光純薬工業(株)製精密分析用、酢酸は関東化学(株)製高速液体クロマトグラフィー用、酢酸アンモニウムは和光純薬工業(株)製高速液体クロマトグラフ用を使用した。

4) ミニカラム

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は Varian 社製 Bond Elut PSA (500 mg) (以下、PSA ミニカラムと略す)、強酸性陽イオン交換体ミニカラムは Varian 社製 Bond Elut SCX (500mg) (以下、SCX ミニカラムと略す)を使用した。

3. 標準液の調製

1) 原標準液の調製

メラミンは10mgを秤量し、50%アセトニトリル水溶液100mLに溶解した。(100 $\mu\text{g/mL}$)

アンメリンおよびアンメリドは10mgを秤量し、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液5mLに溶解した後、50%アセトニトリル水溶液で100mLとした。(各100 $\mu\text{g/mL}$)

メラミン内標準は1mLを分取し、50%アセトニトリル水溶液で10mLとした。(10 $\mu\text{g/mL}$)

2) 混合標準液の調製

前述1)の原標準液から、メラミンの濃度が1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、アンメリンおよびアンメリドの濃度が5.0 $\mu\text{g/mL}$ となるように各々の適量を分取し合した後、50%アセトニトリル水溶液で希釈した。

3) 絶対検量線用標準液の調製

前述2)の混合標準液から適量を分取し、メラミンの濃度が0.005, 0.01, 0.02, 0.03 $\mu\text{g/mL}$ となる

表1 標準添加回収実験に使用した食品

主な成分	食 品 名
乳 (全粉乳など)	牛乳, チョコレート, 冷凍ピザ, 乳幼児用調製粉乳(粉ミルク), コーヒーミックス(粉末), クリーマー(粉末)
鶏卵 (全卵など)	生卵, 卵ボーロ, ビスケット, 冷凍たこ焼き, チョコレートケーキ
その他	乾パン

ように50%アセトニトリル水溶液で希釈した。
(アンメリンおよびアンメリドの濃度は0.025, 0.05, 0.10, 0.15 $\mu\text{g/mL}$)

また、全ての絶対検量線用標準液に対し、メラミン内標準が0.05 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加した。

4) 標準添加回収実験用標準液の調製

前述1)の原標準液から、メラミンの濃度が5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、アンメリンおよびアンメリドの濃度が25.0 $\mu\text{g/mL}$ となるように各々の適量を分取し合した後、50%アセトニトリル水溶液で希釈した。

5) マトリックス検量線用標準液の調製

前述4)の標準添加回収実験用標準液から適量を分取し、メラミンの濃度が0.1 $\mu\text{g/mL}$ となるように50%アセトニトリル水溶液で希釈した。(アンメリンおよびアンメリドの濃度は0.5 $\mu\text{g/mL}$)

4. 装置および測定条件

1) 装置

高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計
LC: (株)島津製作所製 Prominence UFLC
MS: Applied Biosystems 社製 API3200QTRAP

2) 測定条件

分離カラム: インタクト(株)製 アミノプロピル型順相カラム Unison UK-Amino,
150mm $\times$ 2mm ϕ , 粒子径3 μm
移動相: 10mM 酢酸アンモニウムを含む0.1%酢酸水溶液 / アセトニトリル混液(40:60)
カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$
流速: 0.2mL/min
注入量: 5 μL
イオン化法:
ESI(+): メラミンおよびアンメリン
ESI(-): アンメリド
測定モード: MRM モード
なお、質量分析計の詳細なパラメーターを、表2に示した。

表2 質量分析計パラメーター

化合物名	保持時間 (min)	MRM トランジション (m/z)	DP (V)	CE (V)
メラミン	4.72	定量用	127 > 85	46.0
		確認用	127 > 68	41.0
メラミン内標準	4.72	定量用	133 > 89	46.0
		確認用	133 > 71	41.0
アンメリン	5.54	定量用	128 > 86	46.0
		確認用	128 > 69	46.0
アンメリド	7.37	定量用	127 > 84	-30.0
		確認用	127 > 42	-25.0

5. 標準添加回収実験における添加量

標準添加回収実験における試料に対するメラミンの添加量は、通知法の定量下限値である0.5mg/kgとした。また、メラミン内標準の添加量は、通知法に従って1.0mg/kgとした。

アンメリンおよびアンメリドの添加量は、米国食品医薬品庁（FDA）が乳幼児用調製乳以外の食品について設定した「公衆衛生上の懸念を高めないメラミンおよびシアヌル酸等の濃度」である2.5mg/kgを採用した。

6. 試験溶液の調製法

1) 通知法

通知法に準拠し、以下のとおり調製した。

試料 5g を採取し、メラミン内標準の原標準液 0.5mL および 50%アセトニトリル水溶液 25mL を加え、ホモジナイズ（5000rpm, 5min）した。遠心分離（3000rpm, 5min）した後、得られた上澄液を抽出液とした。

メタノール 5mL、50%アセトニトリル水溶液 5mL を順次注入してコンディショニングした PSA ミニカラムに、抽出液 5mL を負荷した後、50%アセトニトリル水溶液 1mL を注入した。溶出液を合一し（溶出液Ⅰ）、1mol/L 塩酸 130μL を加えた。

本溶液を、あらかじめメタノール 5mL、水 5mL を順次注入してコンディショニングした SCX ミニカラムに、全量負荷した。0.1mol/L 塩酸 2mL、メタノール 1mL を洗浄のため順次注入し、流出液は捨て、次いでアンモニア・メタノール溶液（1:19, v/v）5mL で溶出した（溶出液Ⅱ）。

溶出液Ⅱを減圧乾固した後、残留物に 50%アセトニトリル水溶液 10mL を加え、5 分間超音波溶解した。得られた溶液 1mL を分取し、50%アセトニトリル水溶液 1mL を加え、0.2μmPTFE フィルターによりろ過した。得られたろ液を LC/MS/MS 用試験溶液として用いた。以上の操作法を図 2 に示した。

2) 通知法（変法）

試料 2g を採取し、メラミン内標準の原標準液 0.2mL および 50%アセトニトリル水溶液 25mL を加えた。以降、「6. 試験溶液の調製法 1) 通知法」に従って操作した。ただし、減圧乾固した後は、50%アセトニトリル水溶液 4mL を加え、5 分間超音波溶解した。得られた溶液 1mL を分取し、50%アセトニトリル水溶液 1mL を加え、0.2 μmPTFE フィルターによりろ過した。得られたろ液を LC/MS/MS 用試験溶液とした。

試料 5g（変法の場合は 2g）

—— メラミン内標準の原標準液 0.5mL
（変法の場合は 0.2mL）
—— 50%アセトニトリル水溶液 25mL
ホモジナイズ(5000rpm, 5min)
遠心分離(3000rpm, 5min)

上澄液（抽出液）5mL

—— PSA ミニカラム精製
—— 50%アセトニトリル水溶液 1mL

溶出液Ⅰ

—— 1mol/L 塩酸 130μL
SCX ミニカラム精製
—— 0.1mol/L 塩酸 2mL で洗浄
—— メタノール 1mL で洗浄
—— アンモニア・メタノール溶液（1:19）
5mL で溶出

溶出液Ⅱ

—— 減圧乾固
—— 50%アセトニトリル水溶液 10mL
（変法の場合は 4mL）
超音波溶解 5min

1mL 分取

—— 50%アセトニトリル水溶液 1mL
—— フィルターろ過

LC/MS/MS 用試験溶液

図2 試験溶液の調製法

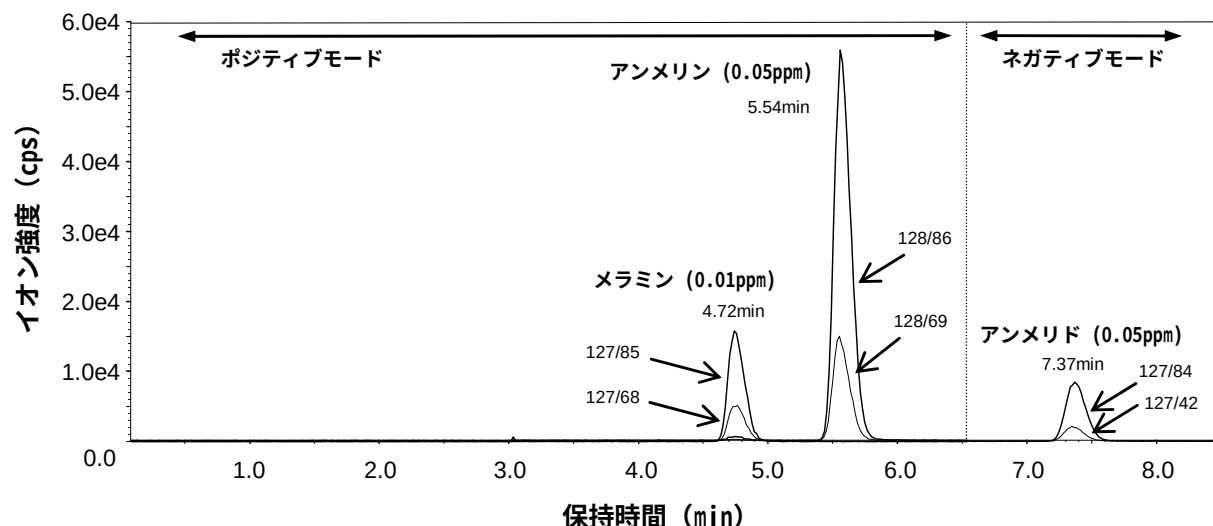


図3 メラミンおよび関連化合物のクロマトグラム

7. 標準添加回収実験

1) 通知法

試料 5g を採取し、標準添加回収実験用標準液 0.5mL、メラミン内標準の原標準液 0.5mL および 50%アセトニトリル水溶液 25mL を加えた。以降、「6. 試験溶液の調製法 1) 通知法」に従って操作したものを、標準添加回収実験の試験溶液とした。

2) 通知法(変法)

試料 2g を採取し、標準添加回収実験用標準液 0.2mL、メラミン内標準の原標準液 0.2mL および 50%アセトニトリル水溶液 25mL を加えた。以降、「6. 試験溶液の調製法 2) 通知法(変法)」に従って操作したものを、標準添加回収実験の試験溶液とした。

実験結果および考察

1. 検出限界および検量線

測定モードについて、アンメリンはポジティブモード、ネガティブモードのいずれによる測定も可能であるが、メラミンの保持時間と近いことを考慮し、メラミンと同じポジティブモードを採用した。また、ポジティブモードからネガティブモードへの切り換えは 6.5min に行った。その結果、全ての化合物を良好に分離することができ、また高感度での測定が可能となった。メラミンおよび関連化合物のクロマトグラムを図3に示した。

クロマトグラムより、各化合物の検出限界はマトリックスを含まない場合、S/N 比 = 3 を基準にすると、最も感度の低いアンメリドが 0.001 μ g/mL であった。そこで、本調査では全ての化合物について、検出限界は 0.001 μ g/mL を採用した。

試験溶液の濃度は、絶対検量線法およびマトリックス検量線法により定量した。いずれの検量線もメラミン内標準を 0.05 μ g/mL 含み、メラミンの濃度が 0.005, 0.01, 0.02, 0.03 μ g/mL、アンメリンおよびアンメリドの濃度が 0.025, 0.05, 0.10, 0.15 μ g/mL となるように調製した標準液を用いて作成し、試験溶液の濃度を考慮して、2~4 点検量により定量した。検量線の直線性については、相関係数は全て 0.995~1.000 の範囲にあり、良好な直線性を示した。メラミンにおける検量線の一例(ビスケット)を図4に示した。

なお、通知法では試料にメラミン内標準を添加しており、本調査においても抽出・精製条件を可能な限り同一にするため添加したが、定量には使用しなかった。

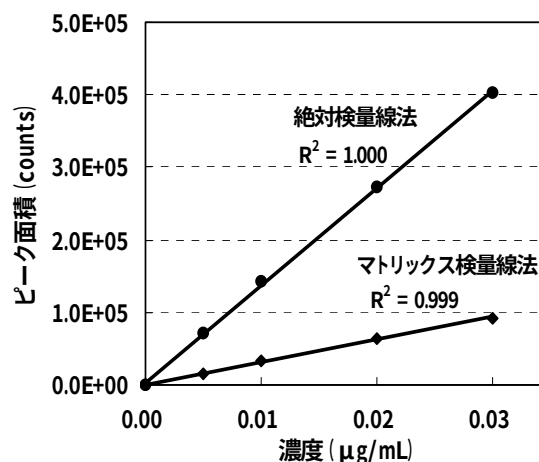


図4 メラミンの検量線(ビスケット)

表3 食品からのメラミンおよび関連化合物の標準添加回収率

(単位：%)

食 品 名	試験法	絶対検量線法 回収率（変動係数）			マトリックス検量線法 回収率（変動係数）		
		メラミン	アンメリン	アンメリド	メラミン	アンメリン	アンメリド
生卵	通知法	83.0 (1.9)	48.1 (5.2)	79.8 (2.6)	86.7 (1.9)	85.4 (5.0)	84.9 (2.6)
冷凍たこ焼き	〃	59.7 (2.5)	35.0 (4.4)	64.4 (7.3)	95.4 (2.6)	92.2 (4.4)	72.6 (7.5)
卵ボーロ	〃	38.7 (2.7)	70.1 (5.1)	84.7 (1.6)	77.7 (2.7)	82.3 (5.1)	88.1 (1.6)
牛乳	〃	27.7 (2.7)	55.4 (2.5)	84.5 (2.5)	84.1 (2.6)	87.5 (2.4)	89.7 (2.5)
乾パン	〃	23.2 (2.0)	23.2 (5.0)	73.3 (4.1)	73.7 (1.9)	78.2 (4.5)	72.2 (4.0)
冷凍ピザ	〃	22.4 (3.7)	22.8 (5.5)	55.2 (5.7)	81.4 (3.5)	78.3 (5.0)	61.9 (5.5)
ビスケット	〃	22.2 (5.4)	29.4 (1.8)	72.6 (5.1)	91.8 (3.0)	83.3 (3.5)	70.4 (1.4)
チョコレートケーキ	〃	17.6 (6.9)	30.6 (1.5)	78.0 (2.2)	97.7 (6.7)	98.7 (1.4)	90.8 (2.1)
チョコレート	〃	12.6 (1.7)	15.0 (2.1)	65.6 (4.5)	89.0 (1.7)	99.8 (2.1)	86.8 (1.9)
蒸留水	〃	94.5 (2.6)	95.9 (3.4)	89.0 (7.3)	90.8 (2.6)	92.2 (3.4)	87.0 (7.3)
粉ミルク	通知法	—	—	—	—	—	—
クリーマー※ ¹	〃	11.8 (3.7)	15.4 (4.8)	0.6 (60.8)	38.1 (3.6)	17.4 (4.6)	1.2 (31.5)
クリーマー※ ²	〃	—	—	—	—	—	—
コーヒーミックス※ ¹	〃	4.8 (4.3)	12.3 (3.4)	37.6 (1.4)	37.5 (3.3)	37.3 (3.1)	75.9 (1.6)
コーヒーミックス※ ²	〃	6.9 (5.7)	7.3 (34.7)	7.6 (27.7)	28.5 (4.4)	13.1 (35.2)	3.9 (29.9)
粉ミルク	通知法（変法）	8.1 (1.5)	29.2 (2.5)	55.0 (3.8)	84.7 (1.4)	109.4 (2.3)	61.8 (3.9)
クリーマー	〃	12.4 (5.2)	48.0 (3.4)	63.4 (3.1)	104.9 (4.9)	126.4 (3.6)	101.9 (3.4)
コーヒーミックス	〃	7.3 (2.7)	13.4 (5.2)	44.8 (3.5)	107.7 (2.5)	104.1 (4.4)	47.1 (3.6)

注1) 試行回数 n=5. ただし, 卵ボーロは n=4.

注2) ‘—’ は, ミニカラムの通液不良により標準添加回収実験を中止.

※1 遠心分離後, 上層のみを採取.

※2 遠心分離後, 下層のみを採取.

2. 標準添加回収率

市販の食品 12 種および蒸留水について実施した標準添加回収実験の結果を, 表3に示す.

1) 通知法

通知法に基づいて分析した食品9種について絶対検量線法で定量した結果, メラミンの回収率は12.6~83.0%, アンメリンは15.0~70.1%となり, 食品により回収率の差が大きかった. また, 70%以上の回収率が得られた食品は, いずれも1種のみであった. これに対して, アンメリドの回収率は55.2~84.7%であり, 食品6種が回収率70%以上であった.

次に, マトリックス検量線法により定量した結

果, メラミンおよびアンメリンの回収率は全て70~100%の範囲内で, 変動係数も10%未満であり, 良好な結果が得られた. アンメリドについても, 冷凍ピザの回収率が61.9%にとどまったものの, その他の食品については良好な結果が得られた.

生卵および冷凍たこ焼きなど食品9種および蒸留水は通知法に準拠した分析が可能であり, 良好な結果が得られたが, 粉ミルク, クリーマーおよびコーヒーミックスの3種は分析の継続が困難であった. これは, 遠心分離後の溶液が2層に分離したり, ミニカラム精製時に通液不良を起こしたりしたことが原因である. したがって, これらの食品は, 通知法の一部を変更して操作を行った.

2) 通知法 (変法)

前述のように、粉ミルク、クリーマーおよびコーヒーミックスの3種は、通知法による分析が困難であった。なお、クリーマーおよびコーヒーミックスについては、遠心分離後の上下層をそれぞれ分析したが、クリーマーの下層は粉ミルクの場合と同様にミニカラム精製時に通液不良を起こし、分析の継続が困難であった。また、コーヒーミックスの場合、上下層の分析が可能であったが、それぞれの層からメラミン等の化合物が検出された。

そこで、溶液の分離やカラムの通液不良を避けるため、試料採取量を2gに減じた。ただし、蒸発乾固後の溶液量を10mLから4mLに変更することにより、最終溶液濃度は通知法による濃度を維持した。

絶対検量線法により定量した結果、イオン化抑制による影響が大きく、メラミンの回収率は7.3~12.4%と非常に低い値であった。イオン化抑制は夾雑成分の残留が原因であることから、通知法(変法)は試料の抽出もしくは精製などの前処理法について、検討を要することが判明した。

マトリックス検量線法では、食品3種におけるメラミンの回収率は、84.7~107.2%と良好な結果が得られた。しかし、アンメリンは食品1種が120%を超過し、アンメリドは食品2種が70%未満であった。

以上の結果、食品中の夾雑成分によるイオン化抑制のため、メラミンおよびアンメリンの回収率は、食品12種全てにおいて、絶対検量線法よりもマトリックス検量線法の方が高い値が得られた。しかし、アンメリドの場合、両法による回収率の差は他の化合物と比較して小さく、絶対検量線法での回収率の方が高い値を示す食品もみられた。

3. 夾雑成分によるイオン化抑制

1) クロマトグラムによる確認

LC/MS/MSによる測定は、試料に含まれる夾雑成分の影響を受けやすいことが知られている。そこで、シリンジポンプで各化合物の標準液(1.0 μ g/mL)をMS部に連続注入しながら、標準添加されていないLC/MS/MS用試験溶液を通常の測定と同様に5 μ L注入し、イオン強度を測定した。注入する試験溶液は、ビスケット、コーヒーミックスおよび対照用として50%アセトニトリル水溶液を選択した。また、各化合物の注入速度は、メラミンは1.0 μ L/min、アンメリンおよびアンメリドは5.0 μ L/minとした。なお、通常ネガティブモードは6.5~8.5minのみの測定であるが、ここでは夾雑成分の影響を確認するため、試料注入時からネガティブモードで測定した。50%アセトニトリル水溶液におけるイオン化抑制例を図5に、ビスケットの例を図6に、コーヒーミックスの例を図7に示した。なお、図中のクロマトグラムのうち、上方は定量イオンを、下方は確認イオンを示し、縦の点線は、それぞれの化合物の保持時間である。

50%アセトニトリル水溶液の場合、全ての化合物において、試料溶媒の溶出時を除き、イオン強度は安定していた。

しかし、ビスケットの場合、ポジティブモードにおいてイオン化抑制によるイオン強度の変動が激しく、保持時間により強度がベースラインの1割程度まで低下していた。メラミンおよびアンメリンの保持時間付近もイオン強度は低下しており、標準添加回収実験での絶対検量線法とマトリックス検量線法による回収率の差を裏付ける結果となった。一方、ネガティブモードにおけるイオン強度の変動は小さく、アンメリドの保持時間付近の変動も小さかった。

また、絶対検量線法とマトリックス検量線法による回収率の差が最も大きかったコーヒーミックスの場合、ポジティブモードで連続的にイオン

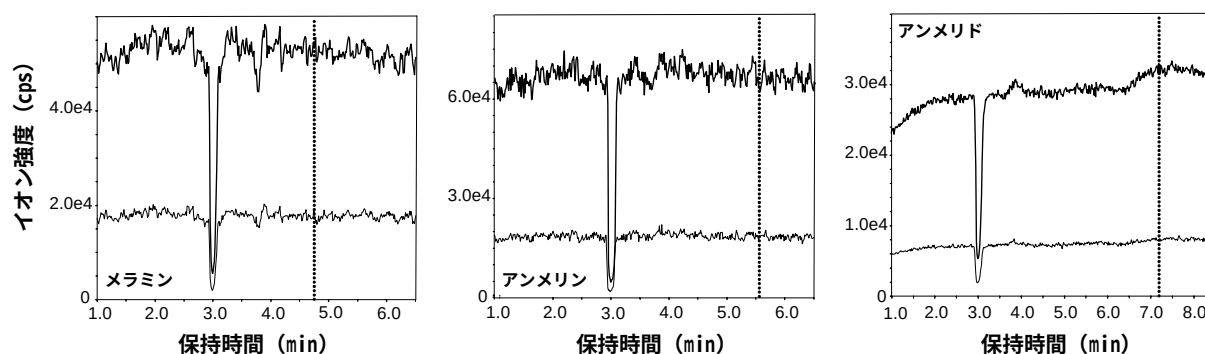


図5 50%アセトニトリル水溶液におけるイオン化抑制例

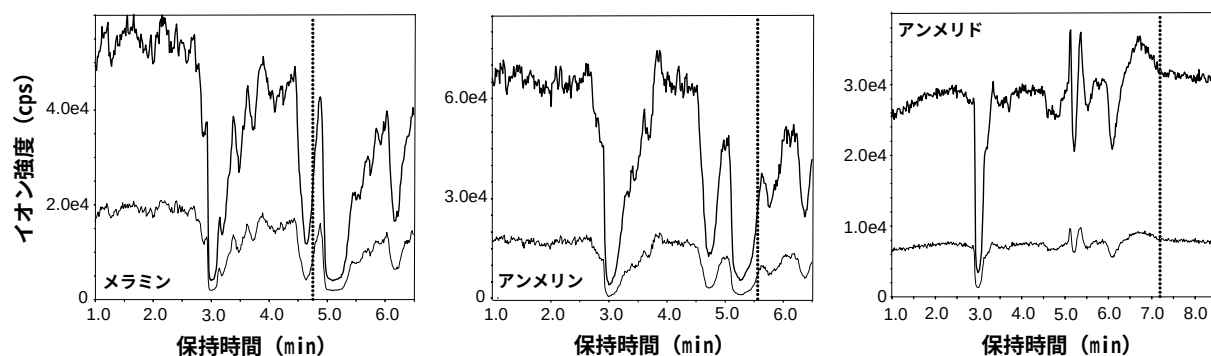


図6 ビスケットにおけるイオン化抑制例

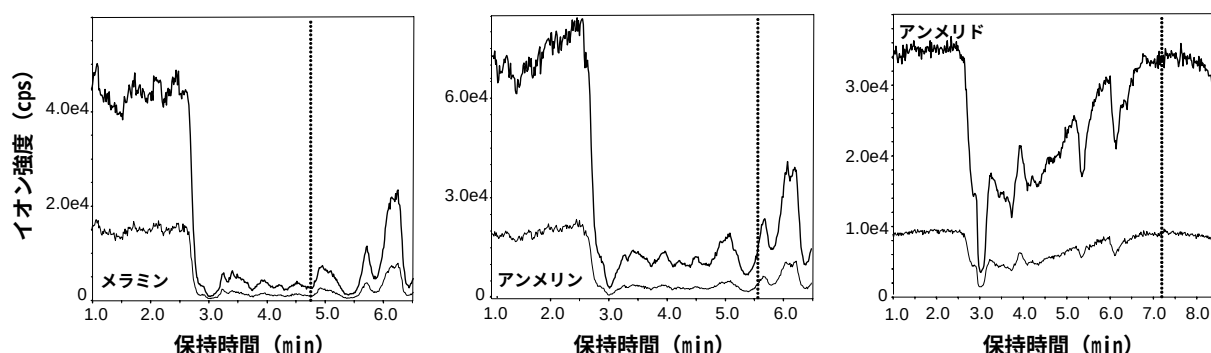


図7 コーヒーミックスにおけるイオン化抑制例

化抑制が見られ、イオン強度は著しく低下していた。ネガティブモードでも試料溶媒が溶出する3.0min付近からイオン強度の低下が見られた。したがって、選択性が高く、夾雑成分の影響を受けにくいとされているネガティブモードについても、食品によっては溶出条件の設定に注意が必要であることが確認された。

2) 希釈によるイオン化抑制の軽減

夾雑成分によるイオン化抑制を軽減する手段として、希釈法がある。そこで、試験溶液を希釈し、回収率（定量値）の推移を検討した。希釈する溶液は、標準添加回収実験の際に調製した冷凍ピザの溶液を使用し、通知法では最後に2倍希釈してLC/MS/MS試験溶液とする操作を、3, 5, 10, 15, 20, 30 および 50 倍に希釈して測定した。その結果を図8に示した。なお、ここでは保持時間が短く、より夾雑成分の影響を受けやすいメラミンを対象とした。

表3より、冷凍ピザのメラミン回収率は81.4%である。図8のように、溶液を50倍希釈して測定することにより、マトリックス検量線法による回収率とほぼ同じ値が得られた。しかし、定量下限値等を考慮すると、冷凍ピザの溶液では50倍希釈での測定が限界であった。したがって、試験

溶液に含まれる夾雑成分は食品によって異なることから、希釈法を用いて定量する場合は、希釈倍率の設定に注意が必要である。

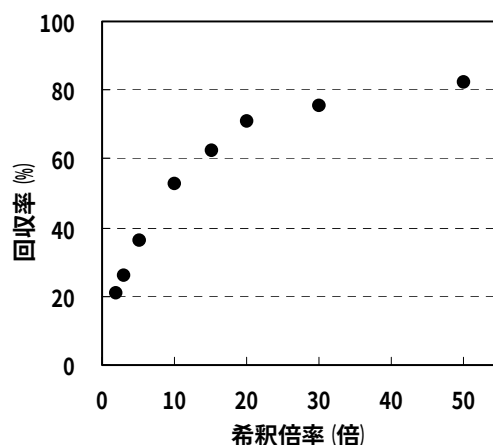


図8 希釈によるメラミン回収率の推移

4. 内標準物質の使用

内標準物質を使用した場合、「メラミン試験法」の回収率における性能基準は40%以上となり、分析対象食品の適用範囲が広がる。これが、アンメリンおよびアンメリドについても同様に適用されることが期待されるが、アンメリンおよびア

ンメリドの内標準物質は市販されていない。また、安定同位体を使用した内標準物質は高価なことが多く、分析コストを考慮すると、それぞれ購入し使用することは困難である。そこで、メラミンの内標準物質が、同一操作で抽出されるアンメリンおよびアンメリドについて、使用可能であるか検討した。

絶対検量線法では、イオン化抑制の影響により回収率の変動が大きく、使用が困難であるのは明らかである。そこで、通知法により標準添加回収実験を実施した食品 9 種および蒸留水について、マトリックス検量線法により得られた回収率を使用し、相関係数による検定を行った。メラミンに対するアンメリンおよびアンメリドの回収率の関係を図 9 に示した。

その結果、相関係数はアンメリンが $r = 0.760$ 、アンメリドは $r = 0.212$ であった。ここで、自由度 $\phi = 10 - 2 = 8$ 、有意水準 $\alpha = 0.05$ とすると、 $r(8, 0.05) = 0.632$ である。したがって、アンメリドは有意な相関が見られなかったが、アンメリンには有意な相関が見られ、メラミン内標準の使用の可能性が示唆された。ただし、今回は検討に使用したデータ数 ($n = 10$) が少ないため、内標準物質の使用に際しては、さらに検討を行う必要がある。

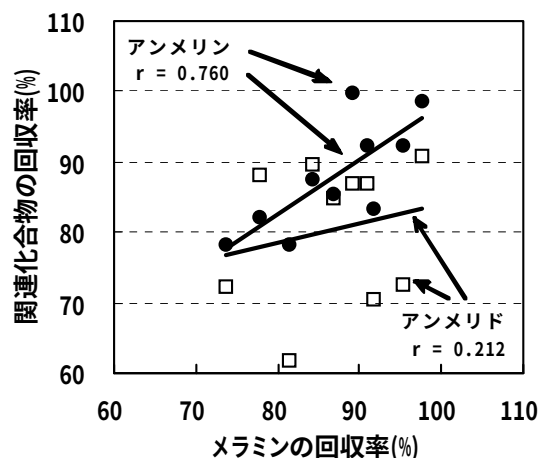


図 9 メラミンおよび関連化合物の回収率

まとめ

通知法である「メラミン試験法」が、メラミンの関連化合物であるアンメリンおよびアンメリドの分析法として適用可能であるか検討したところ、以下の結果を得た。

1. 分離カラムにアミノプロピル型順相カラムを用い、LC/MS/MS により測定を行ったところ、高感度での同時測定が可能であった。
2. メラミンは $0.005 \sim 0.03 \mu\text{g/mL}$ 、アンメリンお

よびアンメリドは $0.025 \sim 0.15 \mu\text{g/mL}$ の範囲で絶対検量線およびマトリックス検量線を作成したところ、いずれも良好な直線性を示した。

3. 食品 12 種について標準添加回収実験を実施し、絶対検量線法を用いて定量したところ、夾雑成分によるイオン化抑制のため、回収率はマトリックス検量線と比較して低い値であった。

4. マトリックス検量線を用いて定量することにより、メラミンおよびアンメリンの回収率は全て 70%以上であった。アンメリドの回収率は食品 9 種で 70%以上であったが、残り 3 種は 40~70%の範囲であった。

5. 通知法による分析が困難な食品は、試料採取量を変更することにより対応した。

6. 夾雑成分によるイオン化抑制を軽減するために希釈法を使用する場合、各食品により夾雑成分が異なるため、希釈倍率の設定には注意が必要である。また、定量下限値も考慮する必要がある。

7. マトリックス検量線法を用いた場合、アンメリンに対する内標準物質として、メラミン内標準の使用の可能性が示唆された。

8. 本調査の標準添加回収実験で使用した食品 12 種から、メラミンおよび関連化合物は検出されなかった。(検出限界 0.02 mg/kg)

なお、メラミンの関連化合物であり、メラミンとの結晶化により腎結石等を誘発したとされるシアヌル酸の分析法については、今後検討する予定である。

文献

- 1) 山本 都, 畝山智香子, 登田美桜, 佐々木史歩, 森川 馨: 米国におけるペットフードや動物飼料のメラミン汚染, 食衛誌, 49, J13-J16 (2008).
- 2) 登田美桜, 山本 都, 畝山智香子, 森川 馨: 中国における乳及び乳製品のメラミン汚染, 食衛誌, 50, J231-J235(2009).
- 3) WHO(2008): Expert meeting to review toxicological aspects of melamine and cyanuric acid, Overall conclusions and recommendations, 1-4 December 2008.
- 4) WHO(2008): Melamine and Cyanuric acid: Toxicity, Preliminary Risk Assessment and Guidance on Levels in Food, 25 September 2008.
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知: 食品中のメラミンの試験法について, 平成 20 年 10 月 2 日, 食安監発第 1002002 号.
- 6) 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, 起橋雅浩, 尾花裕孝: 中国製加工食品中のメラミンの分析, 食

衛誌, 50, 131-134(2009).

- 7) Litzau, J. J., Mercer, G. E., Mulligan, K. J. (2008):
GC-MS screen for the presence of melamine, ammeline, ammelide, and cyanuric acid.
(Laboratory Information Bulletin No. 4423;
<http://www.fda.gov/cvm/gcmsmelamine.htm>)
- 8) Veyrand, B., Elaudais, S., Marchand, Ph. (2008):
Identification et dosage de la mélamine et de ses produits de dégradation dans les aliments par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem, 1-15.
(Méthode LABERCA/08MEL-A1.7;
http://www.laberca.org/newsletter/fr/LABERCA_08MEL-A1-7.pdf)
- 9) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC)：肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法（参考定量法）。
(http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub5_4/LI_1.htm)