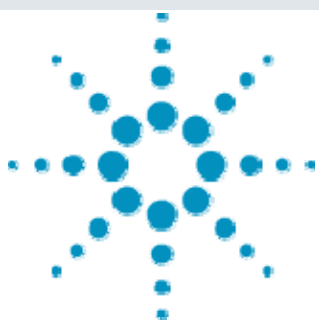




Agilent 6410 による牛乳中メラミンの高感度分析



＜要旨＞ 偽装目的で牛乳中に混入されたメラミンの分析に LC-MS/MS 法を用いた高感度分析法を検討しました。その結果、シリカゲルカラムによる HILIC モード及び ESI 法を用いた LC-MS/MS 法により厚生労働省から出されたメラミン試験法の性能基準に全て適合した測定が可能でした。今回の測定法での定量限界は 9.7ng/g でした。

Key Words: メラミン、牛乳、HILIC、LC-MS/MS、MRM、内部標準法

1. はじめに

メラミンは主にメラニン樹脂の原料に使用される化合物であり、食品に接触する食器や容器等の原料にも使用されることから食品中微量に検出されることがあります。しかし 2007 年 3 月、米国で中国製原料を用いたペットフードを与えたイヌ、ネコが死亡する事件が発生し、原因が故意に原料である小麦グルテン添加されたメラニンによるものでした。さらに 2008 年 9 月、中国でメラミンが不正に混入された乳幼児用調製粉乳が原因と思われる乳幼児の腎結石等の健康被害が報告され、わが国においても中国産乳製品を原料として製造された食品からメラニンが検出されました。これらは全て中国ではたん白含有量を窒素の含有量を指標として測定されていることから、メラミンが偽装に使用されたと考えられています。これに伴い 2008 年 10 月に厚生労働省からメラミンの試験法が出され、試験法の性能基準が設定されました。そこで今回、Agilent 6410 Triple quadrupole LC/MS を用いた牛乳中メラミンの分析法について紹介致します。

2. 装置及び測定条件

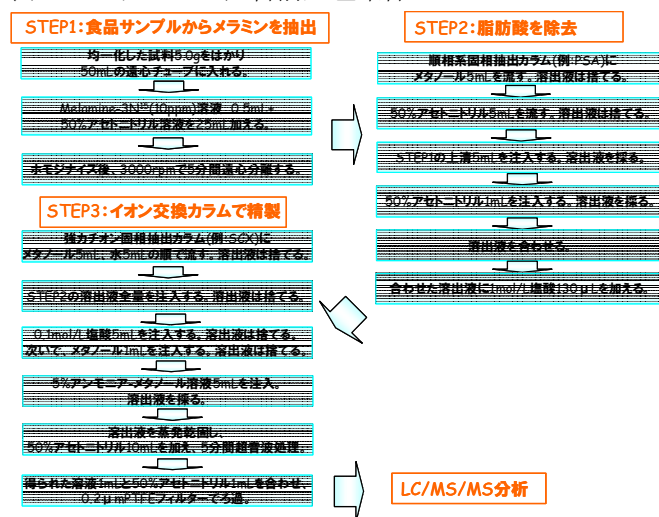
分析条件は表.1 に示した通りです。カラムには順相系シリカカラムを使用し、移動相には 20mM 酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリルを用いました。MS は MRM モードで測定しましたが、プリカーサーイオンには (M+H)⁺ を選択しプロダクトイオンには $m/z=85, 68$ を選択しました。また内部標準物質 (I.S) としてメラミン-¹⁵N₃ を使用し、表.1 に示した MRM 条件で測定しました。

実試料には牛乳を使用し、試料前処理は表.2 に示した通り牛乳中のメラミンを 50%アセトニトリル水溶液で抽出後、PSA 及び SCX カラムにより精製を行いました。また、メラミンの回収率の測定には 1000ng/g のメラミン及びメラミン-¹⁵N₃ を添加した牛乳を用いました。

表.1 IC-MS/MS によるメラミンの分析条件

LC	: 1200LC
Column	: ZORBAX Rx-Sil(150mm, 2.1mm, 5µm)
Mobile phase	: A: 20mMCH ₃ COONH ₄ , B: ACN 85%B
Column temp	: 40°C
Injection volume	: 5µL
Flow rate	: 0.2mL/min
MS	: Agilent 6410 LC-MS
Ionization	: ESI (Positive)
MRM transition	: Melamine: 127>85, 68 Melamine- ¹⁵ N ₃ : 130>87, 44
Collision voltage	: Melamine: 25, 40V Melamine- ¹⁵ N ₃ : 25V
Drying gas	: 10L/min at 350°C
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 100V

表.2 メラミンの試料前処理条件



3. 結果及び考察

標準溶液での結果は図.1 に MRM クロマトグラム、図.2 に検量線を示しました。0.01ng/mL での S/N 比 (Peak to Peak) は 145 であり、S/N=3 を検出限界とした場合、メラミンの検出限界は 0.2ng/mL でした。またメラミン-¹⁵N₃ を I.S とした検量線の決定係数は 0.9999 と直線性は非常に良好でした。



Agilent Technologies

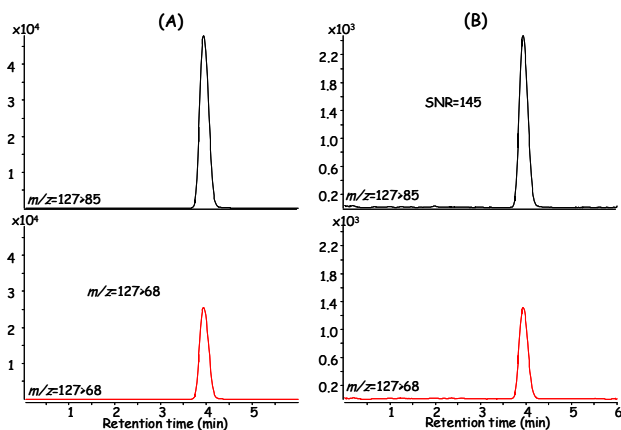


図. 1 メラミンの MRM クロマトグラム
(A):0.2ppm, (B):0.01ppm

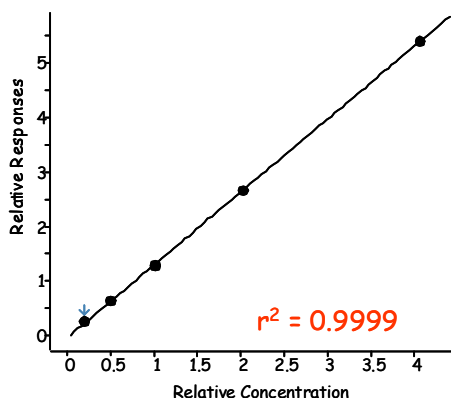


図. 2 メラミンの検量線

実試料には市販牛乳を用いました。その結果、市販牛乳の MRM クロマトグラムは図. 3 に示した通りメラミンの妨害ピークは観察されませんでした。また、1000ng/g 相当添加した I. S の牛乳中からの回収率は表. 3 の通り 65%と試験法の性能評価基準(40%以上)を満たしていました。

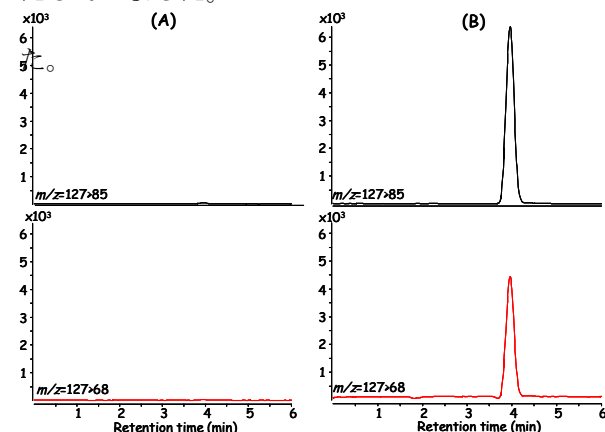


図. 3 市販牛乳中メラミン及び I. S の MRM クロマトグラム (A):メラミン, (B):I. S

図. 4 には1000ng/g 相当のメラミンを添加した牛乳での MRM クロマトグラムを示しましたが、メラミンのターゲット、クオリファイアイオンが $S/N > 500$ で観察され、定量限界($S/N=10$)は 9.7ng/g と性能基準(500ng/g)を十分に満たしていました。また、表. 3 に示した通り

回収率は 102%であり $n=7$ での併行試験の結果は相対標準偏差(RSD)が 0.41%と性能基準を満たしていました(回収率:70-120%、RSD<10%)。

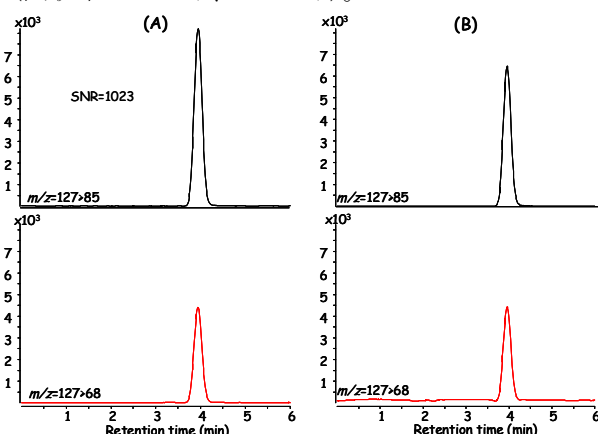


図. 4 標準添加牛乳中メラミン及び I. S の MRM クロマトグラム (A):メラミン, (B):I. S

表. 3 標準液、牛乳でのメラミン、I. S の測定結果

Name	Area	Melamine				I.S	
		Conc.	Accuracy	RT	Ratio	Area	Recovery
STD 0.01	33007	11.1	109	3.94	54	134388	
STD 0.025	83442	25.7	101	3.94	54	130741	
STD 0.05	167240	49.8	98	3.94	53	130271	
STD 0.1	332948	101.0	99	3.94	53	125407	
STD 0.2	666101	203.9	100	3.94	53	123156	
Milk BL	ND	ND	NA	ND	ND	82416	65
P1[milk]	104297	49.2	102	3.96	54	82354	65
P2[milk]	108125	49.3	103	3.95	53	85108	67
P3[milk]	108072	49.5	103	3.95	53	84776	66
P4[milk]	105437	49.1	102	3.96	53	83319	65
P5[milk]	102054	49.6	103	3.97	54	79862	63
P6[milk]	104044	49.4	103	3.96	54	81762	64
P7[milk]	106152	49.7	103	3.95	53	82968	65
Average	105455	49	103	4	53	82878	65
STDEV	2212.25	0.2003	0.417113	0.01	0.31	1797.77	1.40818
RSD	2.10	0.41	0.41	0.16	0.58	2.17	2.17

4. まとめ

今回、シリカカラムを用いた LC-MS/MS による牛乳中メラミンの測定を検討した結果。メラミン- $^{15}\text{N}_3$ を I. S に使用することでメラミンを良好に測定することが可能であり、感度、選択性、(絶対)回収率、再現性の全てにおいて厚生労働省が示したメラミン試験法の性能基準を満たしており、本測定法が牛乳中メラミン測定に有効であることが実証されました。

【LCMS-200811TK-001】

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

www.agilent.com/chem/jp