

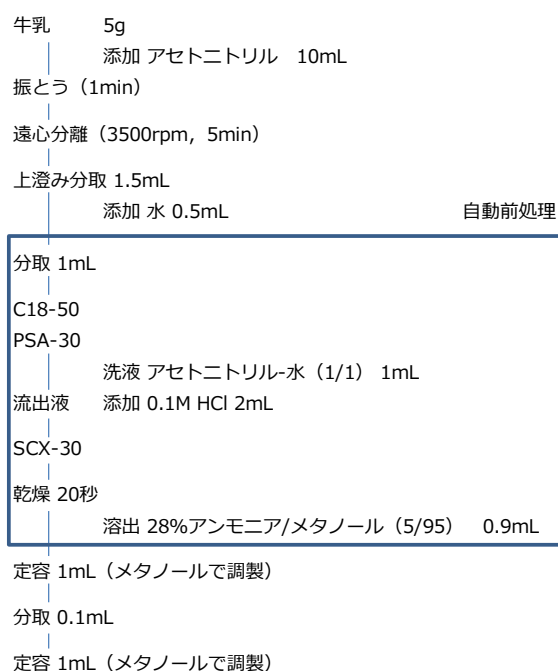
メラミン分析法の自動化の検討

○小西賢治、佐々野僚一
株式会社アイスティサイエンス

【目的】メラミンは、主にメラミン樹脂の原料として使用されるほか、ラミネート、接着剤など様々な工業製品に利用されているが、食品には使用されない。しかし、2007年に中国製ペットフード、2008年に中国製乳幼児用調製粉乳にメラミンが不正に混入され、メラミンが原因と思われる健康被害が多数報告された¹⁾。このような健康被害に素早く対応するため、簡便かつ迅速な前処理を目的として、自動前処理装置を使用した分析法の開発を試みた。

【方法】試料：牛乳(市販品)、標準試薬：メラミン標準品(関東化学)、固相カートリッジ：Smart-SPEシリーズ(アイスティサイエンス)、自動前処理装置：全自動固相抽出装置ST-L300(アイスティサイエンス)、超純水製造装置：PURELAB Ultra(オルガノ)

前処理フロー



測定条件

分析カラム	TSK-GEL AMIDE-80 2.0×150mm (東ソー)		
装置	LC : Prominence(島津製作所)		
	MS/MS : API3200 system(エービー・サイエックス)		
移動相	A : 2mMギ酸アンモニウム+0.1%ギ酸		
	B : アセトニトリル		
流速	0.3ml/min		
注入量	5μL		
イオン化モード	ESI Positive		
測定モード	MRM(Multiple Reaction Monitoring)		
イオン化条件	Q1	Q3	
メラミン	(定量)	127	85
メラミン	(確認)	127	68

【結果と考察】

1. 抽出および除タンパク操作

液体試料(牛乳)からの抽出溶媒にアセトニトリルを選択した。試料にアセトニトリルを加えることでタンパク質が凝固し遠心分離による簡便な除タンパク操作が可能であった。

2. 固相抽出操作

厚生労働省通知²⁾に記されている試験法を参考に、固相ミニカラムPSAによる夾雑物の除去、およびSCXによるメラミンの保持、溶出を行った。抽出溶媒にアセトニトリルを使用したため、脂溶性の夾雑物も同時に抽出されたと考えられた。そこで脂溶性夾雑物の除去を目的として、C18ミニカラムによる精製を追加した。

3. 添加回収試験

0.5mg/kgとなるように牛乳に標準溶液を添加し、添加回収試験を行った。5併行の平均回収率は90%、RSD=3.0%と厚生労働省通知に記された要件を充分満たしている。

1) 食安委、『メラミン等による健康影響について』,(2009年)

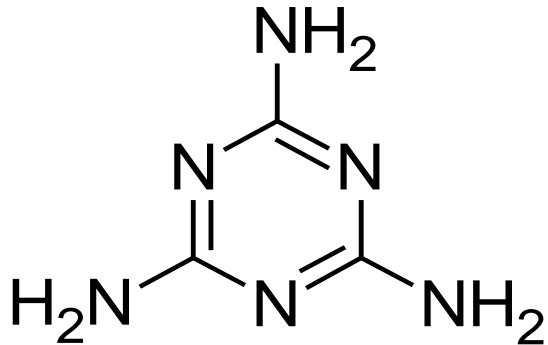
2) 厚生労働省通知食安監発第1002003号(平成20年)

メラミン分析法の自動化の検討



○小西賢治、佐々野僚一
株式会社アイスティサイエンス

メラミンについて



メラミン : Melamin
(2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン)

基準値 : 乳製品	1 mg/kg
その他食品	2.5 mg/kg

本物質は、主にメラミン樹脂の原料として使用されるほか、ラミネート、接着剤など様々な工業製品に利用されている。しかし、2007年に中国製ペットフード、2008年に中国製乳幼児用調製粉乳にメラミンが不正に混入され、メラミンが原因と思われる健康被害が多数報告された。

従来の分析フロー

簡便かつ高精度な分析 (= 自動化)
はできないか？

試料 5g

— アセトリル-水(1/1) 25mL

ホモジナイズ・遠心分離

分取 5mL

PSA 500mg

— 洗液 アセトリル-水(1/1) 1mL

流出液

— 添加 1mol/L塩酸 130uL

SCX 500mg

— 洗浄 0.1mol/L 塩酸 2mL
メタノール1mL

— 溶出 25%アンモニア/メタノール(5/95) 5mL

減圧濃縮・転溶 (アセトリル-水(1/1)10mL)

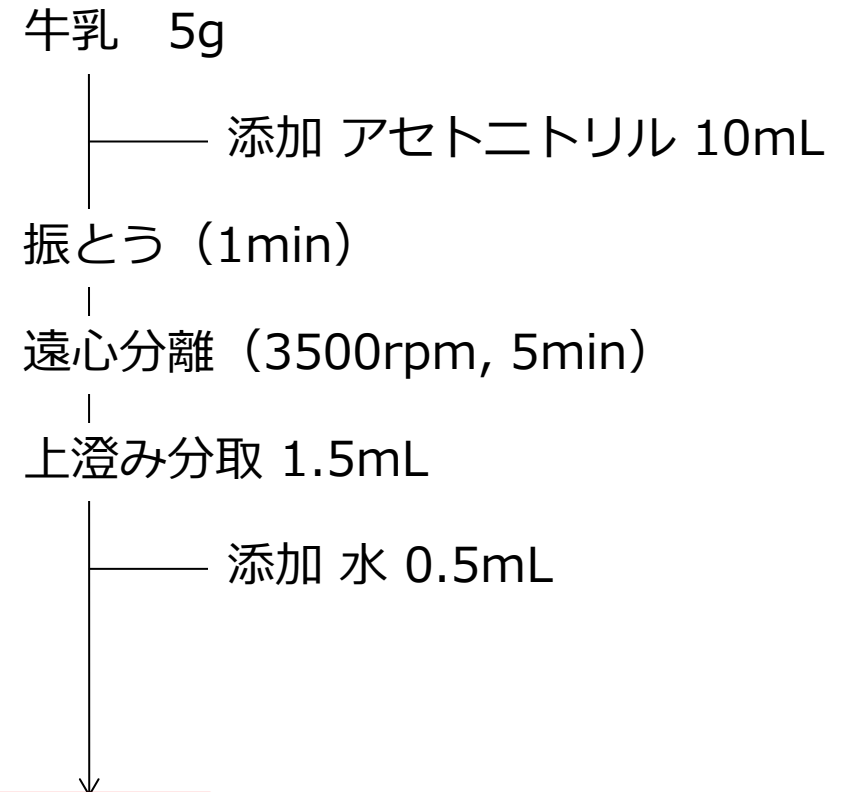
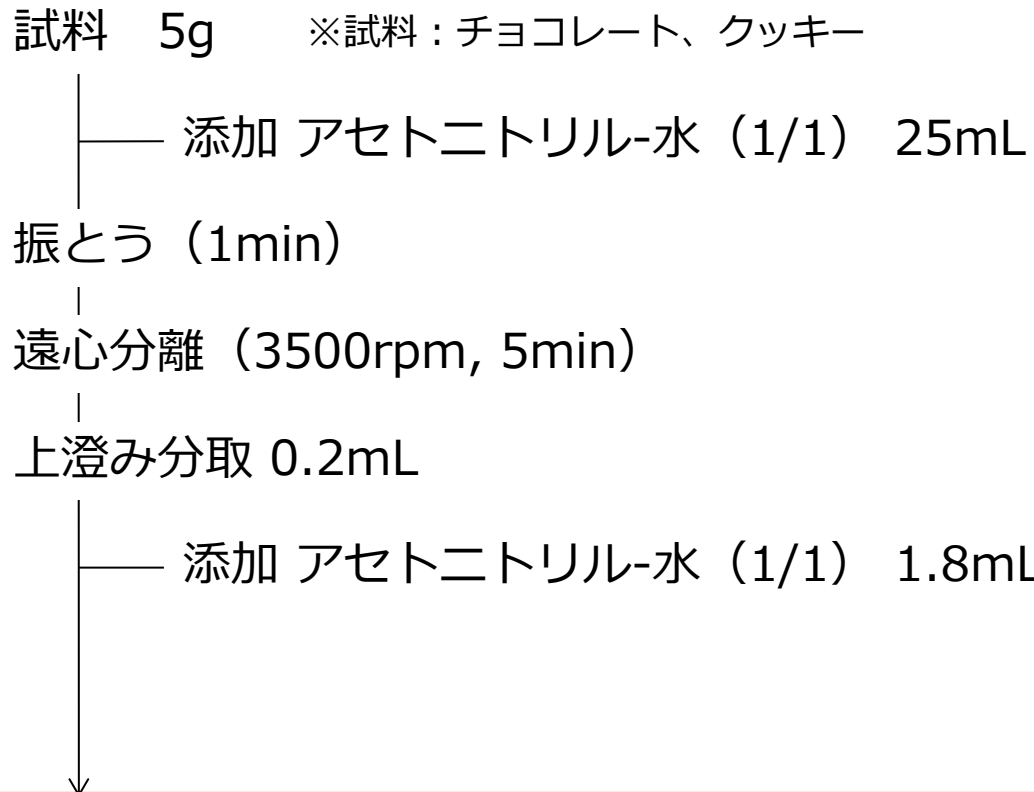
分取1mL

— 添加 アセトリル-水(1/1) 1mL

LC-MS/MSで測定



抽出フロー

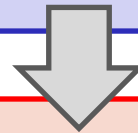


自動固相抽出装置による自動精製

牛乳の場合



アセトニトリル-水(1/1)による抽出では遠心分離をの効果が薄く、全体が白濁したのみであった。



抽出溶媒をアセトニトリルに変更することで、牛乳中のタンパク質が変性・凝固し、遠心分離による除タンパクが可能となった。

精製フロー

自動化

分取 1mL

C18-30mg

PSA-30mg

洗液 アセトニトリル-水 (1/1) 1mL

流出液

添加 0.1M HCl 2mL

SCX-30mg

乾燥 20sec

溶出 28%アンモニア/メタノール (5/95) 0.9mL

定容 1mL

※牛乳の場合はさらに10倍希釈

通知法ではPSA、SCXのみを使用しているが、無極性夾雑物の除去を目的としてC18ミニカートリッジを追加した。

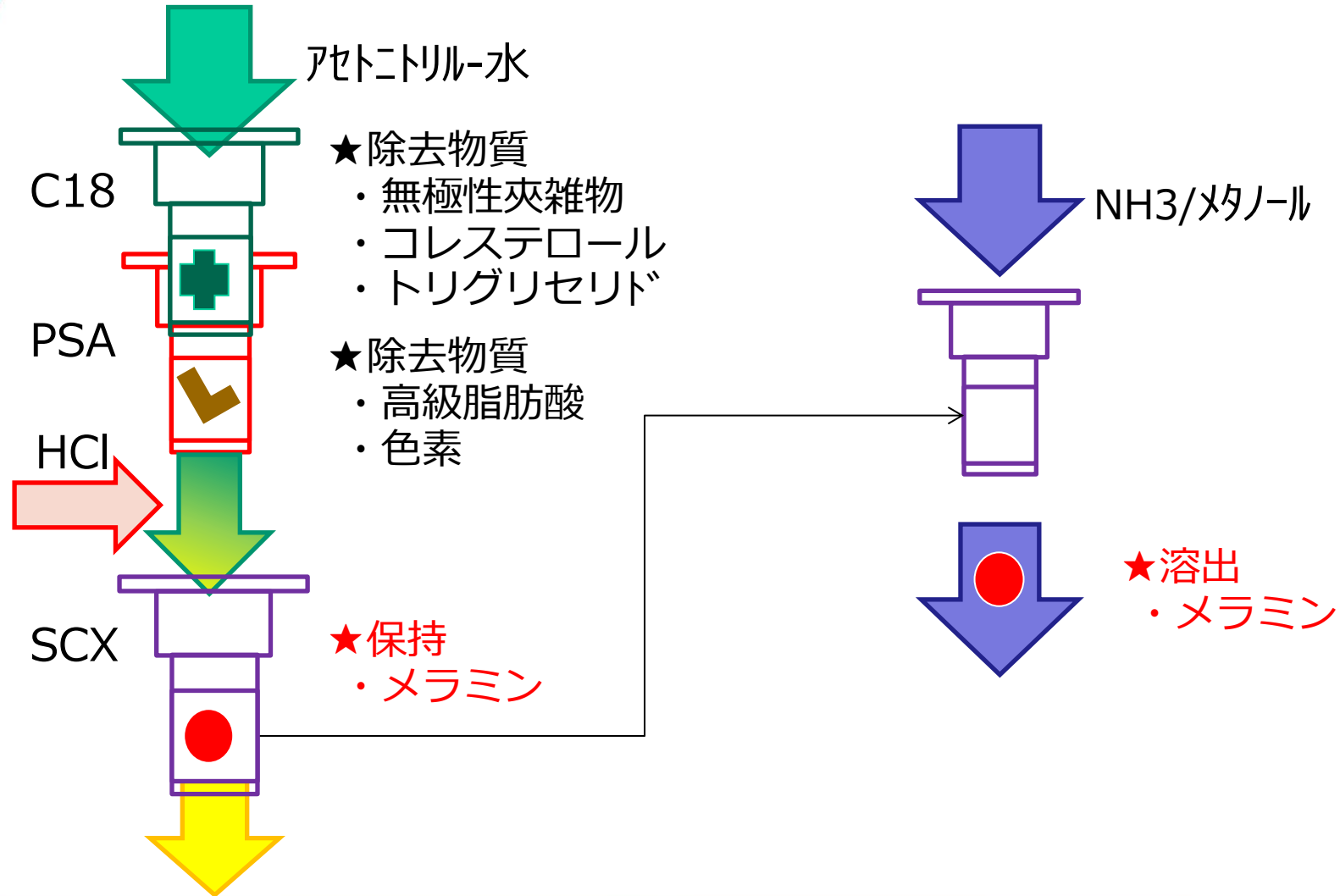
自動前処理装置



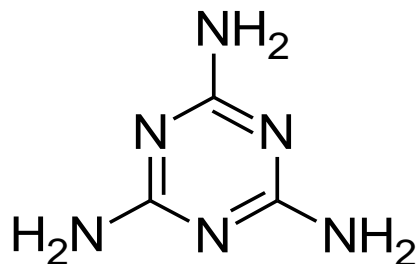
全自動固相抽出装置 ST-L300

- 少量固相Smart-SPEによる前処理の省力化
- コンディショニングから精製まで全自動
- 熟練度による個人差がない

自動化による精製フロー



自動化による精製フロー



メラミン

LogPow : -1.37、 -1.14

解離定数 : 5.00 (25℃) , 5.16 (20℃)

C18 . . . 無極性ミニカラム

無極性夾雑物を除去。極性化合物であるメラミンは素通りできる。

PSA . . . 弱陰イオン交換

自身はプラス電荷をもちやすいため、マイナス電荷をもつ化合物とイオン結合を形成しやすい。メラミンはプラス電荷をもつため、PSAには保持されない。

SCX . . . 強陽イオン交換カラム

常にマイナス電荷を帯びており、プラス電荷をもつ化合物とイオン結合を形成する。メラミンはpH<3でプラス電荷をもつため、保持される。

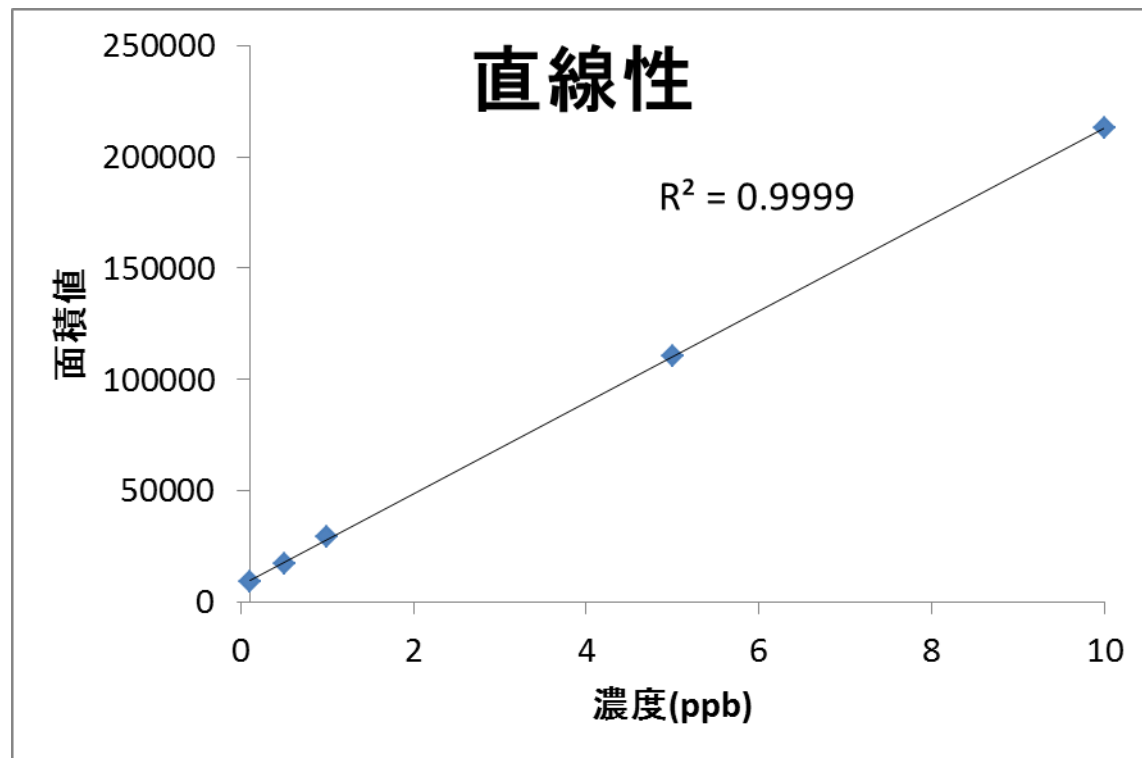


LC-MS/MS測定条件

装置	LC : Prominence(SIMADZU) MS/MS : API3200 system(AB SCIEX)
分析カラム	TSK-GEL AMIDE-80 2.0×150 (TOSOH)
移動相	A : 0.1%ギ酸+2mMギ酸アンモニウム水溶液 B : アセトニトリル
流速	0.3mL/min
注入量	5uL
イオン化モード	ESI Positive
イオンスプレー電圧	5500 V
イオンソース温度	350°C
測定モード	MRM(Multiple Reaction Monitoring) Q3 SCAN(m/z 60-500)
測定イオン	Q1/Q3 : 127/85
グラジエント条件	

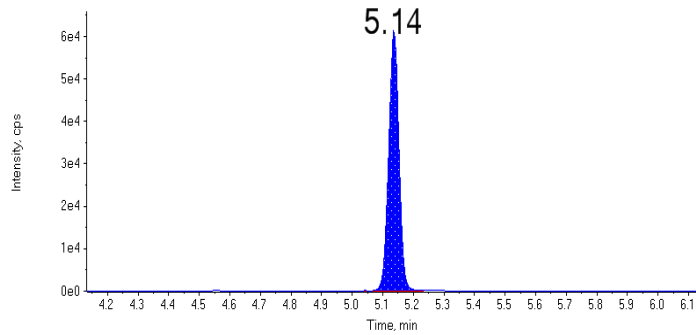
Time(min)	0	1	2	4	6	7	12	12.1	17
A conc.(%)	5	10	40	40	44	90	90	10	10
B conc.(%)	95	90	60	60	56	10	10	90	90

標準溶液の直線性

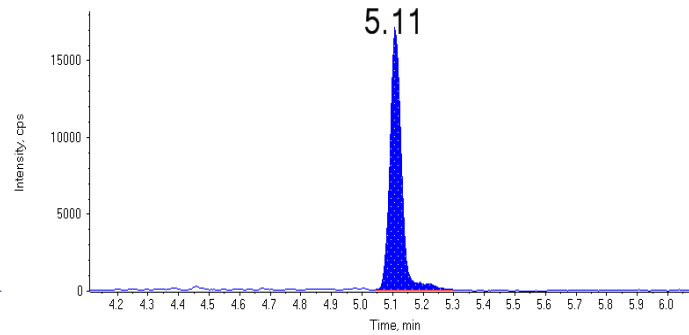


0.1、0.5、1、5、10、50、100ppbの7濃度を各n=5で測定し平均値でプロットしたが、50、100ppbではサチュレーションが観測されたため、バイアル中濃度を0.1~10ppbまでとした。R²=0.999と非常に良好な直線性を示した。

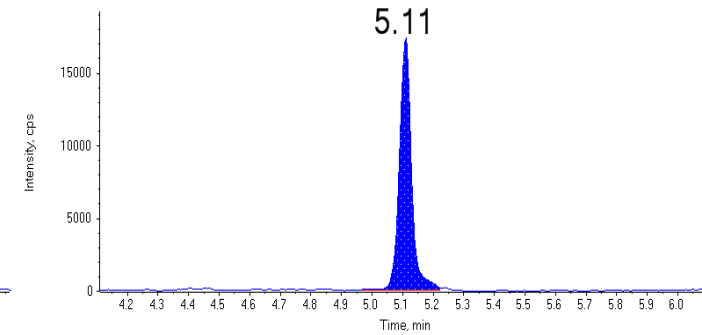
各試料毎の結果



牛乳



チョコレート



クッキー

各試料ともn=5、試料中0.1ppmで添加回収試験を行い、回収率および併行精度を算出した。
 各試料とも良好な回収率と併行精度を示した。

	平均回収率 (%)	RSD (%)
牛乳	90.0	3.0
チョコレート	87.9	3.8
クッキー	94.8	9.8



まとめ

- 自動前処理装置によるメラミン分析の自動化を検討した。
- 液体試料からの抽出溶媒にアセトニトリルを用いることで遠心分離による除タンパクが可能となった。
- 脂溶性夾雑物の除去を目的としてC18ミニカラムによる精製を追加した。
- 添加回収試験により、良好な回収率及び再現性が確認された。



謝辞

～本発表のきっかけ～

江崎グリコ株式会社

グリコ食品安全センター様

～ TSK-GEL AMIDE-80 2.0×150 ～

東ソー株式会社様

～ピュアラボウルトラ（超純水装置）～

オルガノ株式会社様

ありがとうございました。