

11 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)による

作物中のメラミン及びシアヌル酸の同時測定

八木寿治¹, 白井裕治¹

キーワード 作物, メラミン, シアヌル酸, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

1. はじめに

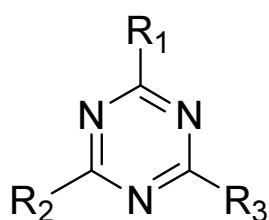
メラミンはメラミン樹脂等の原料として使用され、広く工業的に利用されている。一方、シアヌル酸はメラミン類似化合物であり、塩素系殺菌剤の原料として活用されている。両者が生体内に取り込まれた場合は水素結合により結びつきメラミンシアヌレートとして腎臓等に結石の問題を引き起こすことが知られている。

肥料用途として、メラミンは海外で利用されていることもあるが、国内では流通・利用が認められてはいない。しかしながら、肥料の主要成分である窒素量を見かけ上、かさ上げする欺瞞材として、肥料に意図的に混入されたり、また近年においては石灰窒素を水和造粒する際に生産される副生成物として問題になっている¹⁾。

メラミンが作物中に移行することを示す報告はあるが移行量まで示した報告は乏しく、また、今後メラミンを含有した肥料が故意・過失を問わず施用された場合には、作物中への移行量確認のための分析法が必要となってくる。現在、肥料中のメラミンの分析法は幾つか開発されている^{2~4)}が、同定性の高い作物中のメラミンの分析法の開発は確認できない。

このため FDA が示した食品中のメラミン及びシアヌル酸の定量法⁵⁾(以下、FDA 法とする)を参考に、作物中のメラミン及びシアヌル酸の同時測定法を検討・確認したところ良好な成績を得たのでその概要を報告する。

なお、メラミン及びシアヌル酸の構造式を図 1 に示した。



	R ₁	R ₂	R ₃	MF	MW	CAS No.
メラミン	NH ₂	NH ₂	NH ₂	C ₃ H ₆ N ₆	126.12	108-78-1
シアヌル酸	OH	OH	OH	C ₃ H ₃ N ₃ O ₃	129.07	108-80-5

図1 メラミン及びシアヌル酸の構造式

2. 材料及び方法

1) 供試試料

供試作物としては多種あるが、第一選択として、植害試験で使用されるコマツナ、そして同じく吸収試験等で使用実績のあるチンゲンサイ及びカブ、さらにニンジンを用いた。これら作物は葉部と根部に切り分け洗浄した

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

後、コマツナ、チンゲンサイ及びカブは葉部を、ニンジン根は根部を乾燥器(40℃)で一晩乾燥した後、目開き500µmのスクリーンを通過するまで粉碎し、分析用試料とした。なお、同時に当該部の水分量を測定し、現物換算係数を算出し、現物あたりの定量値を算出できるようにした。

2) 試薬等の調製

- (1) 水: 水精製装置(Elix Advantage5 及び Milli-Q Academic A-10, Millipore)で精製した JIS K 0557 に規定する A4 相当の水を用いた。
- (2) アセトニトリル: JIS K 8032 に規定する特級試薬。
- (3) ぎ酸: LC-MS 用試薬。
- (4) ぎ酸溶液(4 v/v%): ぎ酸 4 mL に水を加えて 100 mL とした。
- (5) ぎ酸アセトニトリル溶液(4 v/v%): ぎ酸 4 mL にアセトニトリルを加えて 100 mL とした。
- (6) アンモニア水: JIS K 8085 に規定する 25 w/w%の特級試薬。
- (7) アンモニア溶液(5 v/v%): アンモニア水 20 mL に水を加えて 100 mL とした。
- (8) ジエチルアミン: 特級試薬。
- (9) ジエチルアミンアセトニトリル溶液(2 v/v%): ジエチルアミン 2 mL にアセトニトリルを加えて 100 mL とした。
- (10) ジエチルアミンアセトニトリル溶液(0.2 v/v%): ジエチルアミン 0.2 mL にアセトニトリルを加えて 100 mL とした。
- (11) 酢酸アンモニウム溶液(1 mol/L): 高速液体クロマトグラフ用試薬。
- (12) 酢酸アンモニウム溶液(10 mmol/L): 酢酸アンモニウム溶液(1 mol/L) 1 mL に水を加えて 100 mL とした。
- (13) メラミン標準原液(100 µg/mL): メラミン[C₃H₆N₆] (和光純薬工業, 食品分析用) 0.01 g をひょう量皿にとり, その質量を 0.1 mg のけたまで測定した。少量のアセトニトリル-水(1+1)で溶かし, 全量フラスコ 100 mL に移し入れ, 標線まで同溶媒を加えた。
- (14) メラミン標準液(10 µg/mL): メラミン標準原液(100 µg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり, 標線までアセトニトリル-水(1+1)を加えた。
- (15) 安定同位体元素標識メラミン(メラミン-¹³C₃¹⁵N₃)内標準液(1 µg/mL): メラミン[¹³C₃H₆¹⁵N₃N₃]標準原液(100 µg/mL) (CIL) 1 mL を全量フラスコ 100 mL にとり, 標線までアセトニトリルを加えた。
- (16) 検量線用メラミン標準液(0 ng/mL~1000 ng/mL): 使用時にメラミン標準液(10 µg/mL)の 0 mL~5 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり, 安定同位体元素標識メラミン内標準液(1 µg/mL)の 0.5 mL を同全量フラスコにそれぞれ加えて標線までジエチルアミンアセトニトリル溶液(2 v/v%)を加えた。
- (17) シアヌル酸標準原液(100 µg/mL): シアヌル酸[C₃H₃N₃O₃] (林純薬工業, 食品分析用) 0.01 g をひょう量皿にとり, その質量を 0.1 mg のけたまで測定した。少量のアセトニトリル-水(1+1)で溶かし, 全量フラスコ 100 mL に移し入れ, 標線まで同溶媒を加えた。
- (18) シアヌル酸標準液(10 µg/mL): シアヌル酸標準原液(100 µg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり, 標線までアセトニトリル-水(1+1)を加えた。
- (19) 安定同位体元素標識シアヌル酸(シアヌル酸-¹³C₃)内標準液(10 µg/mL): シアヌル酸[¹³C₃H₃N₃O₃] (林純薬工業, 食品分析用) 0.001 g をひょう量皿にとり, その質量を 0.1 mg のけたまで測定した。少量のアセトニトリルで溶かし, 全量フラスコ 100 mL に移し入れ, 標線まで同溶媒を加えた。
- (20) 検量線用シアヌル酸標準液(0 ng/mL~1000 ng/mL): 使用時にシアヌル酸標準液(10 µg/mL)の 0

mL～5 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、安定同位体元素標識シアヌル酸内標準液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の 0.5 mL を同全量フラスコにそれぞれ加えて標線までぎ酸アセトニトリル溶液 (4 v/v%) を加えた。

(21) 溶離液用アセトニトリル: LC-MS 用試薬.

3) 器具及び装置

(1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS): Waters Quattro Premier XE

カラム: ZIC-HILIC (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3.5 μm)

(2) P.P.製ねじ口試験管: ジーエルサイエンス DigiTUBEs

(3) 振とう機: iuch AW-1

(4) マニホールド

(5) 遠心分離機: KOKUSAN H-26F

(6) 高速遠心分離機: AS ONE MCD-2000

(7) 強酸性陽イオン交換体カートリッジカラム

: Waters Oasis MCX (充てん剤量 150 mg, 容量 6 mL, 粒径 60 μm)

(8) 強酸性陰イオン交換体カートリッジカラム

: Waters Oasis MAX (充てん剤量 150 mg, 容量 6 mL, 粒径 60 μm)

4) 試験操作

(1) 抽出

分析試料 0.50 g を P.P.製ねじ口試験管 50 mL に入れ、メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 内標準液及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準液を正確にそれぞれ 250 μL 加えた。次にアセトニトリル-水 (1+1) 20 mL を同 P.P.製ねじ口試験管に加え、振とう機で 15 分間振り混ぜた。遠心力 1,300 $\times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄み液を抽出液とした。

(2) 精製

・メラミンの場合

MCX カートリッジカラムを予めアセトニトリル 5 mL 及びぎ酸溶液 (4 v/v%) 5 mL で洗浄し、ぎ酸溶液 (4 v/v%) 3 mL と抽出液 2 mL とを同カートリッジカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。次にアセトニトリル 5 mL 及びジエチルアミンアセトニトリル溶液 (0.2 v/v%) 5 mL を順次同カートリッジカラムに加えて流出させた。試験管 10 mL を同カートリッジカラムの下に置き、ジエチルアミンアセトニトリル溶液 (2 v/v%) 4 mL を同カートリッジカラムに加えてメラミンを溶出させた。溶出液をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ、遠心力 5,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄み液を試料溶液とした。

・シアヌル酸の場合

MAX カートリッジカラムを予めアセトニトリル 5 mL 及びアンモニア溶液 (5 v/v%) 5 mL で洗浄し、アンモニア溶液 (5 v/v%) 3 mL と抽出液 2 mL とを同カートリッジカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。次にアセトニトリル 5 mL を同カートリッジカラムに加えて流出させた。試験管 10 mL を同カートリッジカラムの下に置き、ぎ酸アセトニトリル溶液 (4 v/v%) 2 mL を同カートリッジカラムに加えてシアヌル酸を溶出させた。溶出液をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ、遠心力 5,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄み液を試料溶液とした。

(3) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各検量線用メラミン標準液または各検量線用シアヌル酸標準液 5 μ L を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(以下「LC-MS/MS」という。)に注入し、表 1 の測定条件に従って選択反応検出クロマトグラムを得た。

表1 LC-MS/MS測定条件

カラム	ZIC-HILIC(内径2.1 mm, 長さ150 mm, 粒径3.5 μ m)
溶離液	A:酢酸アンモニウム溶液(10 mmol/L)-アセトニトリル[5+95] B:酢酸アンモニウム(10 mmol/L)[アセトニトリル-水(1+1)]溶液
グラジエント	0 min (0 %B)→10 min (0 %B)→11 min (50 %B) →20 min (50 %B)→21 min (0 %B)→30 min (0 %B)
流速	0.3 mL/min
カラム槽温度	40 °C
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
デソルベーションガス	N ₂ (800 L/h)
コーンガス	Ar (50 L/h)
イオン源温度	120 °C
デソルベーション温度	400 °C
モード	表2のとおり
キャピラリー電圧	表2のとおり
コーン電圧	表2のとおり
コリジョンエネルギー	表2のとおり
モニターイオン	表2のとおり

表2 各物質のモニターイオン条件等

物質名	モード	キャピラリー電圧 (kV)	プリカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (定量用) (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (確認用) (<i>m/z</i>)	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
メラミン	+	4.0	127	85	68	34	25
メラミン- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃	+	4.0	133	89		34	16
シアヌル酸	-	3.5	128	42	85	22	12
シアヌル酸- ¹³ C ₃	-	3.5	131	43		22	10

(4) 計算

得られた選択反応検出クロマトグラムからメラミン及びメラミン-¹³C₃¹⁵N₃ のピーク面積またはシアヌル酸及びシアヌル酸-¹³C₃ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のメラミン量またはシアヌル酸量を算出した。

なお、定量法の概要を図 2 に示した。

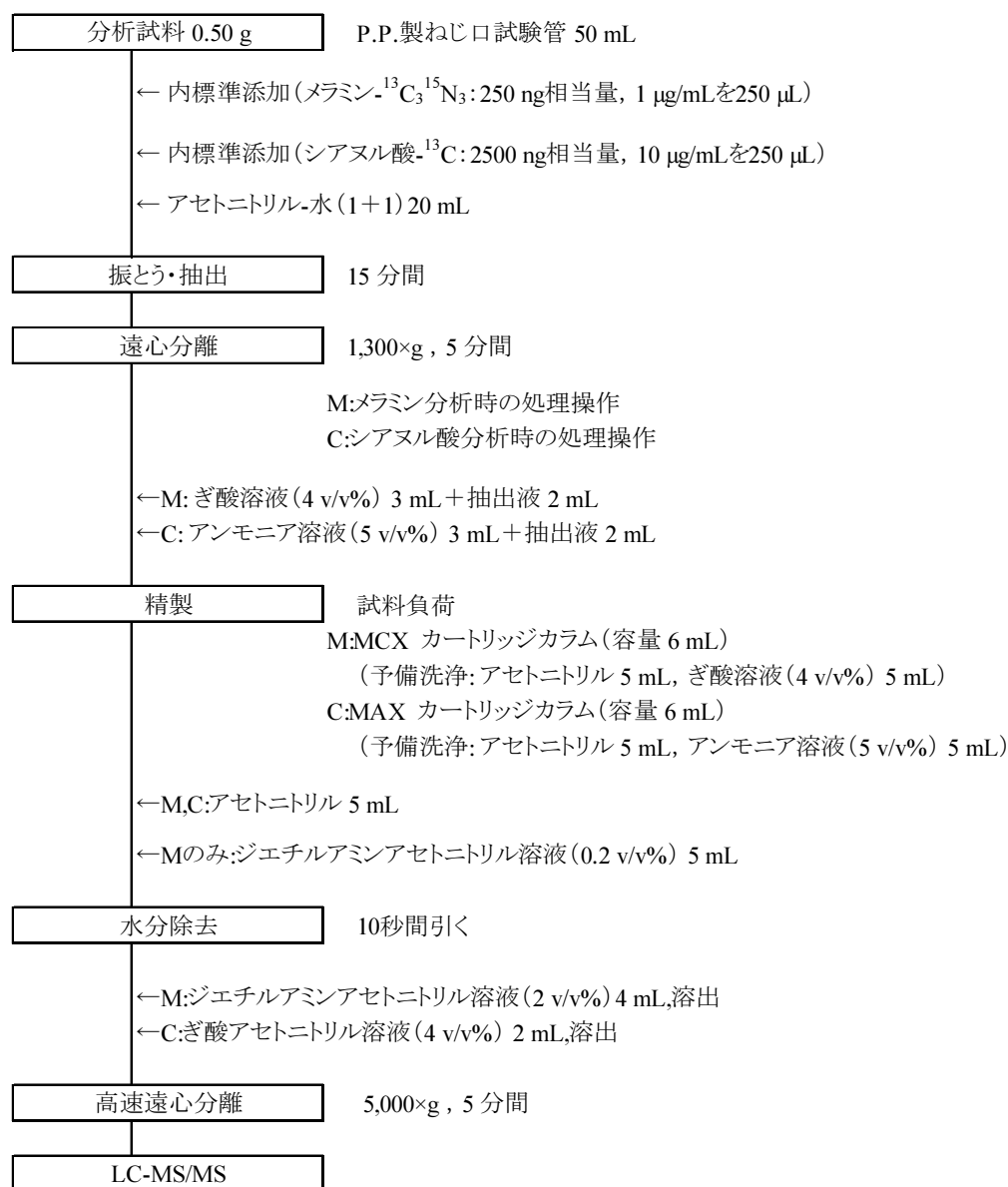


図2 作物中のメラミン及びシアヌル酸の定量法フロー

3. 結果および考察

1) 試料溶液の調製及び測定条件の検討

本法はFDA法と比較して主として以下の点を変更した。FDA法においては試料採取量が5gであるが、本法においては3.3)の検討を踏まえて0.5gとした。また、ホモジェナイザーによる抽出ではなく、振とう抽出を採用し、一部試料について溶出操作後の最終調製液に懸濁が認められたため高速遠心分離の操作を追加した。その他、LC-MS/MS測定条件の一部を今回検討に用いた機種に合わせて表1及び表2のとおりに変更した。

2) 検量線の作成

2.2)の(16)及び(20)に従って調製した標準液を5µL, LC-MS/MSに注入し、得られた選択反応検出クロマト

グラムからメラミン及びメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ のピーク面積またはシアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ のピーク面積を求めて内標準法による検量線を作成した。その結果、メラミン及びシアヌル酸とも 1 ng/mL~1,000 ng/mL (注入量として 5 pg~5,000 pg) の範囲で直線性を示した。参考として検量線の一例を図 3 及び図 4 に示した。

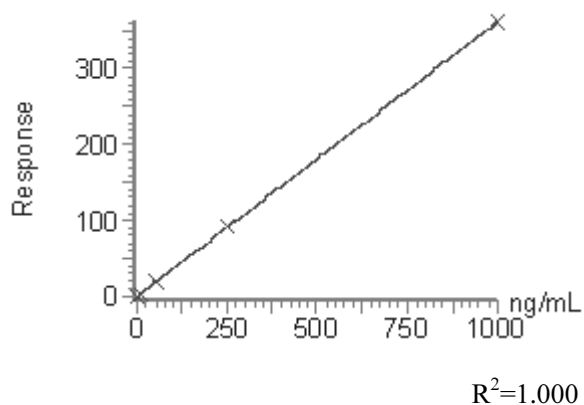


図 3 メラミンの検量線

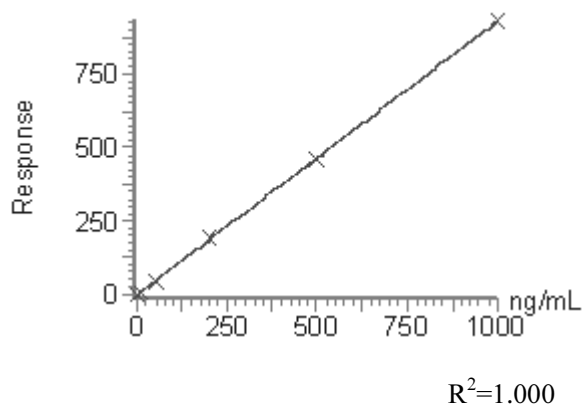


図 4 シアヌル酸の検量線

3) 試料供与量の検討

FDA 法においては、試料採取量を 5.0 g とし、以降 2.4) に従い試料溶液の調製を行っている。しかしながら、今回用いた作物に関しては、試料供与量が多すぎて予め添加した内標準物質の回収率が芳しくなかった。これは最終溶液中の夾雑成分の影響によるイオン化抑制効果が働いたためであると考えられた。当該効果を回避するには最終溶液中に共存している夾雑成分量を減らすことが有効であるため、試料採取量を段階的に 1.0 g 及び 0.5 g と減らし、以降 2.4) に従い試料溶液の調製を行い、内標準物質の回収率向上の検討を行うこととした。これら一連の結果を表 3 に示した。内標準であるメラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$ 及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の回収率は試料採取量を減らすほど向上した。内標準の回収率の基準としては 40 % 以上が推奨・目標とされている^{6, 7)}。このため、この基準を満足した試料採取量 0.5 g を本法に採用した。

なお、内標準の回収率を確認することと同時に、試験的にメラミン及びシアヌル酸としてそれぞれ 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加して、添加回収試験による当該成分の回収率確認も行ったが、試料供与量が 5.0 g の場合の真度(回収率)及び精度は試料供与量 1.0 g または 0.5 g に比べてやや悪かった。

表3 試料供与量の検討

作物種類	試料供与量 (g)	成分名	添加量 ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 ^{b)} (%)	標準偏差 (%)	相対標準偏差 (%)
コマツナ	5.0	メラミン	2,000	119.3	5.6	4.7
		シアヌル酸	2,000	109.0	15.5	14.2
		メラミン- $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$	-	26.2	1.2	4.4
		シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	-	4.0	0.6	15.4
	1.0	メラミン	2,000	101.3	1.5	1.5
		シアヌル酸	2,000	103.4	6.4	6.2
		メラミン- $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$	-	32.2	1.0	3.3
		シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	-	44.8	1.5	3.4
	0.5	メラミン	2,000	92.3	2.0	2.2
		シアヌル酸	2,000	88.7	7.3	8.3
		メラミン- $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$	-	54.6	0.8	1.6
		シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	-	67.1	3.6	5.3

a) メラミン及びシアヌル酸は乾作物に対する添加量
メラミン- $^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}_3$ 及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ は図2のとおりに添加した。

b) $n=3$ の平均回収率

4) 妨害物質の検討

各供試試料について、本法により調製した試料溶液を $5 \mu\text{L}$, LC-MS/MS に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

5) 添加回収試験

各供試試料に、乳児用調製乳以外の食品のメラミン基準値である $2,500 \mu\text{g}/\text{kg}$ を参考にし⁸⁾、当該濃度付近の $2,000 \mu\text{g}/\text{kg}$ と $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量のメラミン及びシアヌル酸を添加し、本法に従って 3 点併行分析を行った。得られた平均回収率及び併行相対標準偏差を表 4 に、その際得られた内標準の平均回収率及び併行相対標準偏差を表 5 に示した。カブ中のシアヌル酸はピーク検出が困難であり定量することができなかった。また、チンゲンサイのシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ も回収率は 40 %を著しく下回った。これらは作物中の夾雑成分によるイオン化抑制が原因と考えられ、シアヌル酸はメラミンに比べて夾雑成分の影響を受けやすい可能性が示唆された。このため、内標準の回収率が 40 %以上得られ、本法による定量が可能な作物は、メラミンについては今回供試したすべての作物について適用可能であり、シアヌル酸についてはコマツナ及びニンジンであった。それらのメラミンの平均回収率は 78.2 %~109.7 %、相対標準偏差(RSD)は 1.1 %~11.3 % であり、シアヌル酸の平均回収率は 83.7 %~109.1 %、相対標準偏差(RSD)は 2.7~8.3 % と良好な回収率及び併行精度が得られた。また、参考として、当該添加回収試験で得られた併行 HorRat 値(HorRat_r)についても表 4 に示した。HorRat_rは分析方法の精度の評価をするために用いられており、HorRat_rは $\text{RSD}_r/\text{PRSD}_r$ により求められる。PRSD_Rは平均定量値から Horwitz の修正式⁹⁾より求め、PRSD_rは Horwitz の修正式に係数 (5/8) を乗じて求めた^{10, 11)}。その結果、HorRat_rは 0.10~0.98 であり、いずれも 2 以下であった¹²⁾。

その他、標準液及び添加回収試験で得られたコマツナにおける選択反応検出クロマトグラムの一例を図 5 に示した。

表4 添加回収試験結果

作物種類	成分名	添加量 ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 ^{b)} (%)	標準偏差 (%)	相対標準偏差 (%)	HorRat _r
コマツナ	メラミン	500	109.7	9.6	8.7	0.80
		2,000	92.3	2.0	2.2	0.24
	シアヌル酸	500	83.7	2.3	2.7	0.24
		2,000	88.7	7.3	8.3	0.90
チンゲンサイ	メラミン	500	78.2	8.9	11.3	0.98
		2,000	103.5	6.7	6.4	0.72
	シアヌル酸	500	106.5	3.8	3.5	—
		2,000	109.1	8.2	7.5	—
カブ	メラミン	500	85.6	7.6	8.9	0.78
		2,000	98.7	4.4	4.5	0.50
	シアヌル酸	500	N.D.	N.D.	N.D.	—
		2,000	N.D.	N.D.	N.D.	—
ニンジン	メラミン	500	99.5	1.1	1.1	0.10
		2,000	101.7	5.2	5.1	0.56
	シアヌル酸	500	88.0	5.2	5.9	0.52
		2,000	98.7	5.7	5.8	0.64

a) 乾燥作物に対する添加量

b) $n=3$ の平均回収率

表5 内標準の回収率

作物種類	成分名	添加量 ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 ^{b)} (%)	標準偏差 (%)	相対標準偏差 (%)
コマツナ	メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$	500	56.7	0.8	1.5
		2,000	54.6	0.8	1.6
	シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	500	44.4	1.8	4.1
		2,000	67.1	3.6	5.3
チンゲンサイ	メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$	500	45.8	1.7	3.7
		2,000	49.8	3.0	6.1
	シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	500	8.2	0.0	0.5
		2,000	10.7	0.3	2.7
カブ	メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$	500	50.8	2.2	4.3
		2,000	48.1	1.7	3.5
	シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	500	6.2	2.2	35.8
		2,000	5.4	1.8	32.8
ニンジン	メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$	500	60.6	2.4	4.0
		2,000	59.9	3.5	5.8
	シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$	500	44.3	2.4	5.4
		2,000	41.4	0.4	1.1

a) 乾燥作物に対するメラミンまたはシアヌル酸の添加量(表4に対応)

b) $n=3$ の平均回収率

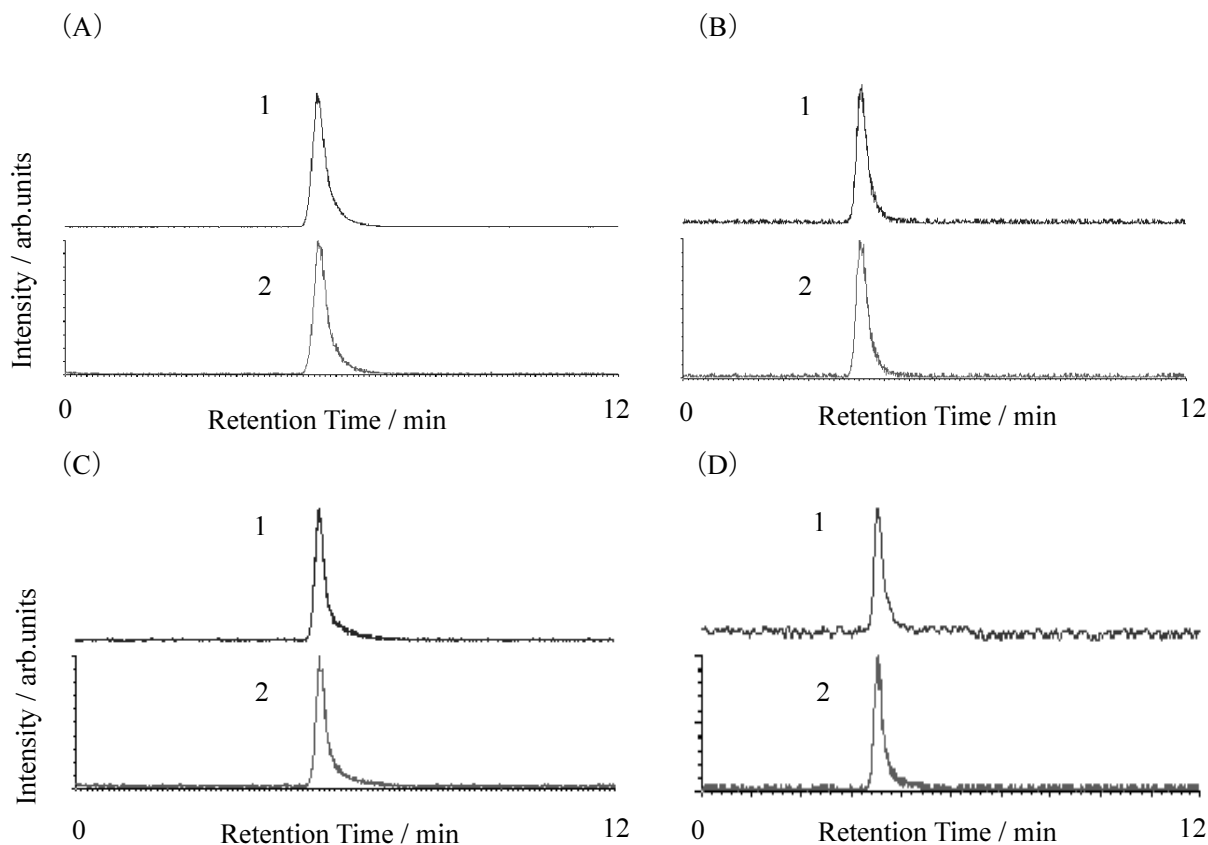


図5 添加回収試験で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例

- (A) 標準液 (1: メラミン 250 ng/mL, 2: 内標準, メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$)
 (B) 標準液 (1: シアヌル酸 200 ng/mL, 2: 内標準, シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$)
 (C) 試料溶液 (コマツナ, 1: 試料中メラミン 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量添加, 2: 内標準, メラミン- $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}_3$)
 (D) 試料溶液 (コマツナ, 1: 試料中シアヌル酸 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量添加, 2: 内標準, シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$)

6) 定量下限及び検出下限

コマツナ及びニンジンを用いて、分析試料中のメラミン及びシアヌル酸の含有量として各 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ になるようにそれぞれ添加して、7点併行試験を実施し、メラミン及びシアヌル酸の定量下限及び検出下限の確認試験を行った結果を表 6 に示した。定量下限は(標準偏差) $\times 10$ 、また、検出下限は(標準偏差) $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$ として示されるので、本法の定量下限及び検出下限はメラミンについては 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度及び 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度、シアヌル酸については 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度及び 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度と推定された。

なお、コマツナ及びニンジンの水分含有量は 90 %程度であるため、現物あたりの定量下限及び検出下限はメラミンについては 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度及び 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度、シアヌル酸については 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度及び 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度と推定された。

表6 定量下限等の確認試験結果

作物種類	成分名	含有量 ^{a)}	平均定量値 ^{b)}	標準偏差	(μg/kg)	
					定量下限 推定値 ^{c)}	検出下限 推定値 ^{d)}
コマツナ	メラミン	500	484.8	41.2	412	201
	シアヌル酸	500	433.2	26.8	268	131
ニンジン	メラミン	500	395.9	25.4	254	124
	シアヌル酸	500	469.1	30.8	308	151

- a) 各成分の含有量
 b) 7点併行試験の平均値
 c) 標準偏差×10
 d) 標準偏差×2×t(n-1,0.05)

4. まとめ

作物中のメラミン及びシアヌル酸の同時測定法の妥当性確認のための試験を実施したところ、次の結果を得た。

- 1) 内標準法を用いてピーク面積により検量線を作成したところ、メラミン及びシアヌル酸とも 1 ng/mL ~1,000 ng/mL (注入量として 5 pg ~5,000 pg) の範囲で直線性を示した。
- 2) コマツナ、チンゲンサイ、カブ、ニンジンについて本法に従ってメラミン及びシアヌル酸の測定を実施した結果、定量を妨害する夾雑ピークはなかった。
- 3) コマツナ、チンゲンサイ、カブ、ニンジンについてメラミン及びシアヌル酸の含有量が 500 μg/kg 及び 2,000 μg/kg になるように添加し添加回収試験を実施した結果、各作物中のメラミンは良好な回収率が得られ、平均回収率は 78.2 %~109.7 %、その併行精度は相対標準偏差 (RSD) として 11.3 %以下であった。また、チンゲンサイ及びカブ中のシアヌル酸は定量ができなかったが、コマツナ及びニンジンでは良好な回収率が得られ平均回収率は 83.7 %~109.1 %、その併行精度は相対標準偏差 (RSD) として 8.3 %以下であった。
- 4) 本法のコマツナ及びニンジン中のメラミン及びシアヌル酸の定量下限及び検出下限はメラミンについては 500 μg/kg 程度及び 200 μg/kg 程度、シアヌル酸については 300 μg/kg 程度及び 150 μg/kg 程度と推定された。なお、コマツナ及びニンジンの水分含有量は 90 %程度であるため、現物あたりの定量下限及び検出下限はメラミンについては 50 μg/kg 程度及び 20 μg/kg 程度、シアヌル酸については 30 μg/kg 程度及び 15 μg/kg 程度と推定された。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局農産安全管理課長通知:石灰窒素の肥料登録に関する当面の取扱いについて、平成 23 年 4 月 15 日, 23 消安第 524 号 (2011)
- 2) 白井裕治, 大木純:ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法による肥料中のメラミン及びその関連物質の同時測定, 肥料研究報告, **1**, 114~121 (2008)
- 3) 田村勉, 水野和俊, 秋元里乃, 高橋佐貴子, 白井裕治:副産植物質肥料等中のメラミン及びシアヌル酸の定性試験法, 肥料研究報告, **1**, 168~172 (2008)
- 4) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC):肥料等試験法 (2012)

<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>

- 5) Michael Smoker and Alexander J. Krynitsky: Interim Method for Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues In Foods using LC-MS/MS: Version1.0, U.S Food and Drug Administration, Laboratory Information Bulletin LIB 4422 (2008)
- 6) 大島 慎司: 飼料中のメラミンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法, 飼料研究報告, **36**, 1~12 (2011)
- 7) 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 1002003 号 (2008)
- 8) 食品安全委員会: メラミン等による健康影響について, 平成 20 年 10 月 9 日 (2008)
- 9) Thompson, M.: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385~386 (2000)
- 10) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix E: Laboratory Quality Assurance, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2005)
- 11) Horwitz, W., Kamps, L.R., Boyer, K.W.: Quality control. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, *J. AOAC Int.*, **63** (6), 1344~1354 (1980)
- 12) Codex Alimentarius: CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION PROCEDURAL MANUAL Twentieth edition, p.66 (2011)

Simultaneous Determination of Melamine and Cyanuric acid in Crops by Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS)

Toshiharu YAGI¹ and Yuji SHIRAI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

An analytical method for simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in crops (qing-geng-cai, turnip, carrot and komatsuna) by liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS) was inquired. After addition of 20 mL of acetonitrile-water (1+1), melamine-¹³C₃¹⁵N₃ and cyanuric acid-¹³C₃ to sample 0.50 g, they were shaken for extraction. The extract was centrifuged for 15 min at 1,300×g. The sample solution for melamine analysis was purified by strong acidic cation-exchange mini column (Waters, Oasis MCX) with 4 mL of diethylamine acetonitrile solution (2 v/v%). On the other hand, the sample solution for cyanuric acid analysis was purified by strong acidic anion-exchange mini column (Waters, Oasis MAX) with 2 mL of formic acid acetonitrile solution (4 v/v%). They were analyzed by LC-ESI-MS/MS in positive mode for melamine, or in negative mode for cyanuric acid. The LC separation was carried out on an hydrophilic interaction chromatography column (MERCK, SeQuant ZIC-HILIC, 2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm) using solvent gradient with ammonium acetate solution (10 mmol/L) – acetonitrile [5+95] and ammonium acetate solution (10 mmol/L) [acetonitrile solution (50 v/v%)] as a mobile phase. The determination was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode.

A spiked test was conducted with four kinds of crops spiked with 500 and 2,000 μg/kg of melamine or cyanuric acid. As a result, although melamine has been applied in four kinds of crops, cyanuric acid has been analyzed only two kinds of crops(carrot and komatsuna). The spike test of melamine resulted in recoveries ranging from 78.2 % to 109.7 % and in relative standard deviations (RSD) within 11.3 % respectively. And the spike test of cyanuric acid resulted in recoveries ranging from 83.7 % to 109.1 % and in relative standard deviations (RSD) within 8.3 % respectively. On the basis of 7 replicate measurements of spiked samples(carrot and komatsuna), the LOQ values were estimated melamine 500 μg/kg, cyanuric acid 300 μg/kg in dry crops and melamine 50 μg/kg, cyanuric acid 30 μg/kg in actual thing crops. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of melamine and cyanuric acid in crops.

Key words crops, melamine, cyanuric acid, simultaneous determination, liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS)

(Research Report of Fertilizer, **5**, 114~125, 2012)