

GC/MS と水系順相 LC/MS/MS による ペットフード中のメラミン およびシアヌル酸の分析

アプリケーション

食品

著者

Wei Luan and Yanyan Fang
Agilent Technologies (Shanghai) Co., Ltd.
412 Ying Lun Road
Shanghai 200131
P. R. China

Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington DE 19808
USA

要旨

Agilent 7890A、5975C GC/MS と 1200SL-6410 トリプル四重極 LC/MS を使用して、ペットフードおよびその原料中のメラミンとシアヌル酸を分析しました。GC/MS 法では抽出とトリメチルシリル誘導体化を行い、スクリーニング法を使用しました。検出下限は 10 µg/g です。LC/MS/MS 法では抽出のみで、5 mM 酢酸アンモニウム水溶液とアセトニトリルの移動相を用いた順相系シリカカラム (Rx-Sil) でのアイソクラティック溶出をおこないました。2 つの化合物の分離には 5 分を要しました。直線範囲は、メラミンで 50 pg/mL ~ 50 ng/mL です。複雑な食品マトリクス中の対象化合物の分析における LC/MS/MS メソッドについて紹介します。

緒言

ペットフード中に不正に添加されたメラミンとシアヌル酸により、猫や犬の死亡事故が発生しています。これにより、米国 FDA は過去 1 年間に数百万袋のペットフードのリコールを行いました。ペットフードと関連原料中のメラミンとシアヌル酸の含有量測定は、世界的に重大な問題になっています。

米国 FDA は、これらの化合物に関する GC/MS を用いたスクリーニング法を発表しました [1]。注入前にトリメチルシリル誘導体化処理を用いた GC/MS スクリーニング法の検出下限は 10 µg/g です。この方法はスクリーニングに使用しますが、Agilent 5975 の SIM/スキャン機能を用いた確認や定量にも使用できます。GC/MS 法と比較して、ここで紹介する LC/MS/MS 法では誘導体化がないため試料前処理が簡素化され、一度に確認と定量を行うことができます。さらに、LC/MS/MS の高感度と選択性により、動物体液や組織中の微量分析から、食品や食品原料中の高濃度分析まで対応することができます。

実験

試料前処理

GC/MS の試料前処理は FDA 法 [1] に従い行いました。サンプル 0.5 g に混合溶媒 (10:40:50 ジエチルアミン:水:アセトニトリル) を加え、試料全体をよく混ぜます。



次に、混合物を 10 分間超音波槽にかけ、5,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上澄液を 0.45 μm ナイロンディスクを用いてバイアルにろ過します。抽出物の 200 μL をオートサンプリングバイアルに移し、70 $^{\circ}\text{C}$ で低流量の乾燥窒素で乾固します。乾固した抽出物に、ピリジン 200 μL と N,O-bis-(トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (BSTFA) 200 μL を添加します。混合物をボルテックスミキサーで混合し、70 $^{\circ}\text{C}$ で 45 分間、加温します。

LC/MS/MS の試料前処理は、ミルでサンプル 5g を砕き、よくかき混ぜます。試料 0.5 g にアセトニトリル/水 (50:50) 20 mL を添加し、キャップを付けてボルテックスミキサーで混合します。溶液を 30 分間超音波にかけた後、0.20 μm PTFE シリンジフィルタ (部品番号 5185-5843) でろ過します。対象化合物の濃度がメソッドの直線範囲を超える場合、アセトニトリル水溶液を用いて抽出物をさらに希釈する必要があります。シアヌル酸とメラミンが高濃度で同じ溶液中に存在する場合、イオン対を壊すために 10:40:50 ジエチルアミン:水:アセトニトリルが必要です。

GC/MS メソッドの詳細

機器: 7890A GC、5975C MSD
ソフトウェア: MSD ChemStation E.01.00、NIST 05a MS ライブラリ 2.0d 搭載

GC 条件

カラム: DB-5MS 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm (部品番号: 122-5532)
注入口温度: 290 $^{\circ}\text{C}$
注入モード: スプリットレス/スプリット (1:20)
注入量: 1 μL
キャリアガス流量: He (定流量)、1.3 mL/min
オープンプログラム: 75 $^{\circ}\text{C}$ (1 分間保持)、30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 300 $^{\circ}\text{C}$ (2 分間保持)
総分析時間: 10.5 分
トランスファライン温度: 280 $^{\circ}\text{C}$

MS 条件 (SIM/スキャンモード)

チューン: オートチューン
取込モード: EI、SIM/スキャンモード
溶媒ディレイ: 3.5 分
MS 温度: 230 $^{\circ}\text{C}$ (イオン源)、150 $^{\circ}\text{C}$ (四重極)

スキャンパラメータ

スキャン範囲: 40 ~ 450 amu
サンプリングスピード: 2 (スキャン速度: 最高 3.6 スキャン/秒)
リミット値: 100

SIM パラメータ

グループ 1

グループ ID: Auto_1
分解能: 低
プロット 1 イオン: 345.10
グループ内のイオン/デュエル:

質量	デュエル	質量	デュエル	質量	デュエル
188.00	25	330.10	25	345.10	25

グループ 2

グループ ID: Auto_2
分解能: 低
グループ開始時間: 6.76
プロット 1 イオン: 327.20
グループ内のイオン/デュエル:

質量	デュエル	質量	デュエル	質量	デュエル	質量	デュエル
197.00	25	285.10	25	327.20	25	342.20	25

LC/MS メソッドの詳細

機器: 1200 SL RRLC、6410 トリプル四重極 MS
ソフトウェア: MassHunter B.01.03

LC 条件

カラム: ZORBAX Rx-Sil、2.1 mm × 150 mm、5 μm (部品番号 883700-901)
カラム温度: 40 °C
移動相: A = 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液
A = 5 mM 酢酸アンモニウムのアセトニトリル溶液
流量: 0.4 mL/min
注入量: 10 μL
アイソクラティック: 95% B
ストップタイム: 5.5 分
ニードル洗浄: 50:50 アセトニトリル/水、ポート洗浄 10 秒間

MS 条件

イオン源: ESI
極性: ポジティブとネガティブ
ネブライザガス: 窒素
イオンスプレー電圧: 4,000 V
イオン源温度: 350 °C
分解能: Q1 (ユニット) Q3 (ユニット)
スキャンモード: マルチリアクションモニタリング (MRM)
セグメント: セグメント 1 = 0 ~ 2 分、ネガティブモード、シアヌル酸に対して
セグメント 2 = 2 ~ 5.5 分、ポジティブモード、メラミンに対して
デルタ EMV: 600 V

マルチリアクションモニタリング (MRM) のパラメータを表 1 に示します。

表 1. シアヌル酸とメラミンの MRM パラメータ

時間	化合物	プリカーサ	プロダクト	デュエル (ms)	フラグメンター (V)	衝突エネルギー (V)
1.45	シアヌル酸	128	42	200	100	30
		128	85	200	100	5
4.92	メラミン	127	85	200	100	20
		127	68	200	100	35

結果と考察

GC/MS の SIM モードでのモニタリングイオンの選択

選択イオンモニタリング (SIM) は、検出下限や定量再現性の向上のためによく使用されます。SIM モードでは、カラムから対象化合物が溶出するリテンションタイム (RT) 範囲内の各対象化合物の 2 ~ 3 のイオンだけをモニタリングします。2 ~ 3 の特定イオンだけをモニタリングすることで、シグナルイオン比 (S/N) は大幅に向上します。そのため、優れた分析結果を得るためには、SIM モードでモニタリングするイオンの選択が非常に重

要です。通常、SIM には最も強度の高い 2 ~ 3 のイオンを選択し、対象化合物の応答を最大に引き上げます。しかし、マトリクスからの干渉が大きい場合、強度が比較的低くても、最も特徴的なイオンを選択してシグナルの乱れを最小にする必要があります。このアプリケーションノートでは、図 1 にイオン選択の影響を示しました。より特徴的なイオンを使用することで、クロマトグラムの干渉は最大強度イオンによるクロマトグラムよりも少なくなります。SIM/スキャンを使用すると、測定対象化合物のフルスペクトルでの同定という利点とともに、最高の感度と再現性の両方を達成することができます。

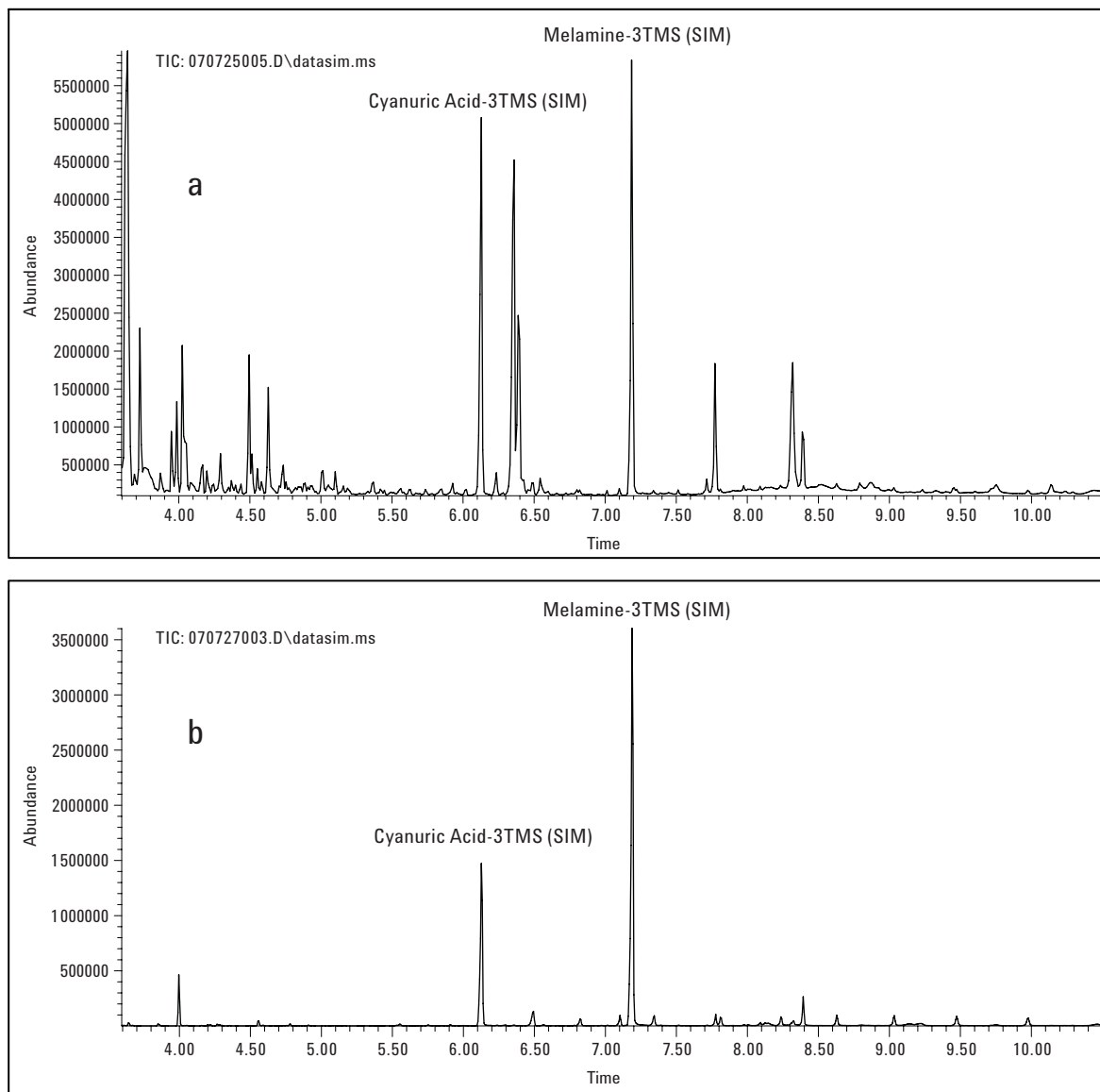


図 1. SIM モードでモニタリングされるイオンの選択の影響をスパイクしたドライペットフードで示しました。
 a) 最高アブダンスのイオンを使用 (シアヌル酸: m/z 73、147、171; メラミン: m/z 327、330、342、345) と
 b) 特徴的なイオンを使用 (シアヌル酸: m/z 188、330、345; メラミン: m/z 197、285、327)。

順相カラムでのメラミンとシアヌル酸の保持力

メラミンやシアヌル酸のような小さな極性化合物の液体クロマトグラフ分離は、イオン交換とイオン対逆相液体クロマトグラフ (IP-RPLC) などの保持メカニズムで実現できます。一般的に、イオン交換法は高濃度の緩衝液を使用するためにエレクトロスプレーインタフェース (ESI) にあまり適していません。同様に、揮発性イオンペア試薬は満足できる結果を提供できますが、LC/MS での日常的な使用には適していません。

さらに、同じ分析で酸と塩基両方のイオンペア分離は困難です。これらの化合物に適した手法は、水系順相クロマトグラフィーや親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) として知られています [2]。このモードの分離は、相対的に非極性の移動相と固定相に関連して形成された半固定化極性液相間での極性測定対象化合物の分配として定義されます。順相クロマトグラフィーは通常、固定相での測定対象化合物の吸着に関連しています。このモードでは、水は固定相表面に捕捉され、吸着の代わりに分配を引き起こします。これらの条件下、Rx-Sil カラムでそれぞれ 1.45 分と 4.92 分のリテンションタイムで、シアヌル酸とメラミンの両方をうまく保持できます。

さまざまなマトリクス中のメラミンとシアヌル酸の定量分析

時間分割プログラムを使用してシアヌル酸用の負イオンモードとメラミン用の正イオンのモードを切り替えました。各濃度で3回の繰り返し注入を行うことで、開発した分析法の直線性を検証しました。メラミンの検量線を図2に示します。分析法の直線範囲は、メラミンで50 pg/mL ~ 50 ng/mLです。メラミンとシアヌル酸の検出下限を図3に示します。

S/N比(ピーク to ピーク)は、50 pg/mL メラミンに対して12.7、1 ng/mL シアヌル酸に対して12.8です。ペットフード、小麦グルテン、コーンミール、米タンパク質を抽出し、両方の対象化合物を分析しました。添加した小麦グルテンサンプルの例を図4に示します。アセトニトリルと水の混合液(50:50)が、さまざまなマトリクスからのメラミンとシアヌル酸の抽出に最も有効です。サンプルを10 µL注入する場合、抽出物をアセトニトリルで5%以下の水分量に希釈する必要があります。そうしないと、ピークが歪みます。あるいは、注入量を1 µLに減らすと簡単に歪みをなくすることができます。

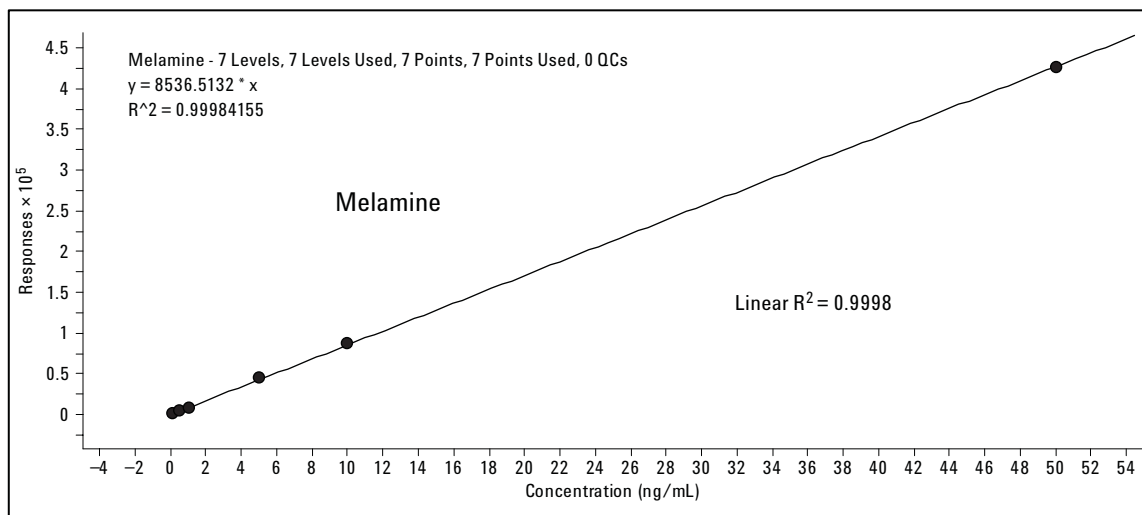


図2. メラミンの直線性

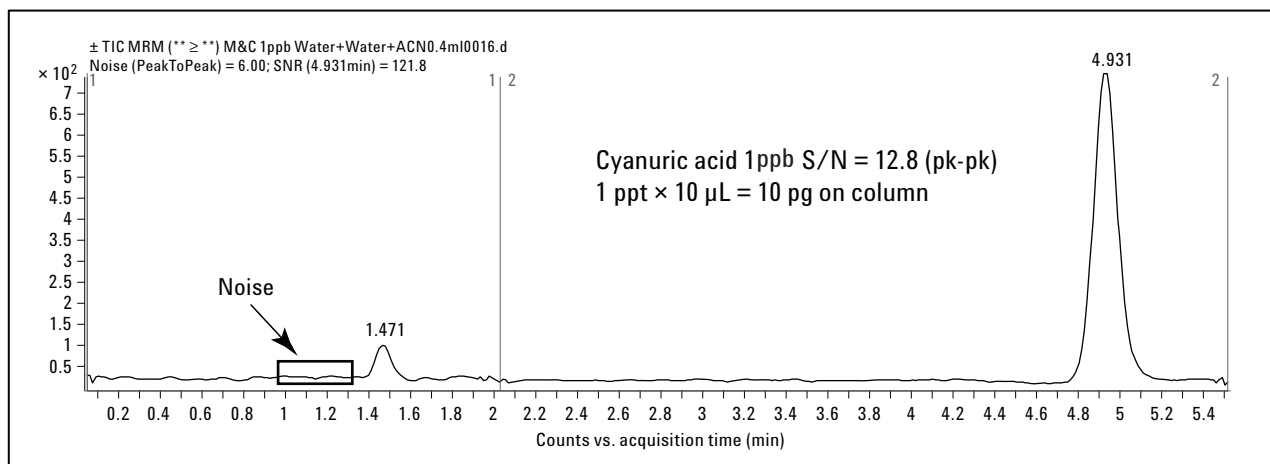
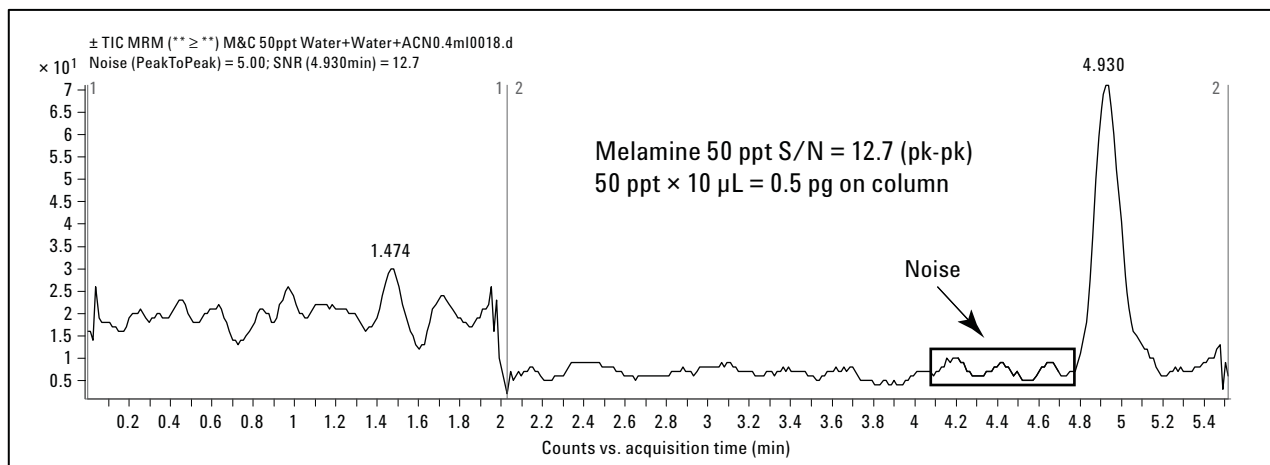


図 3. メラミンとシアヌル酸の検出下限

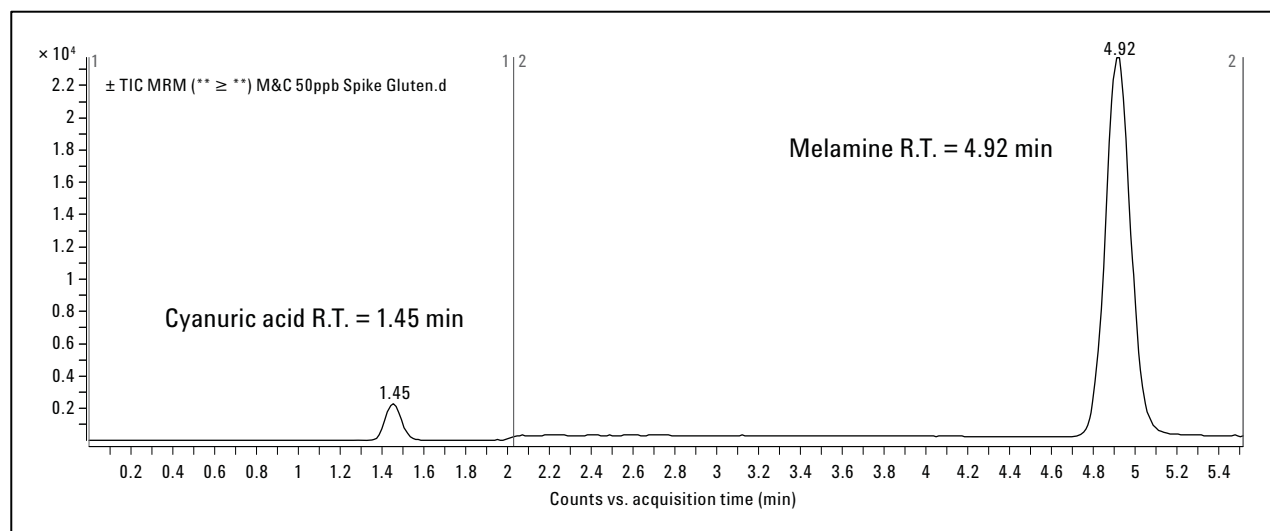


図 4. スパイクした小麦グルテンサンプルの全リアクションモニタリングクロマトグラム

結論

このアプリケーションノートでは、GC/MS または LC/MS/MS メソッドによるペットフードとその原料中のメラミンとシアヌル酸の分析例を示しました。GC/MS で SIM モードを用いたペットフード中のメラミンとシアヌル酸のスクリーニングを紹介しましたが、非常に低い検出下限が要求されなければ、SIM/スキャンモードでも定量や確認にこのメソッドを使用できます。さらに、LC/MS/MS メソッドでは、シンプルなサンプル前処理と水系順相分離について示しました。このメソッドは感度と選択性が高く、ペットフードと関連原料中のメラミンとシアヌル酸の確認と定量の両方に用いることができます。検出下限はメラミンで 50 pg/mL、シアヌル酸で 1 ng/mL です。動物体液や組織中の微量化合物についても簡単に分析できます。

参考文献

1. GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide and Cyanuric Acid, Version 2, May 7, 2007.
<http://www.fda.gov/cvm/MelaminePresence.htm>
2. K. I. Petrus Hemström, "Hydrophilic interaction chromatography." *Journal of Separation Science* **2006**, 29, (12), 1784-1821.

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2007

Printed in Japan
October 31, 2007
5989-7546JAJP