Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

粉ミルクおよび乳児用調製乳中のメラミン、シアヌル酸およびジシアンジアミドの質量検出によるスクリーニング

Mark E. Benvenuti, Michael S. Young, Gareth E. Cleland, and Jennifer A. Burgess
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- メラミン、シアヌル酸(CA)およびジシアンジアミド(DCD)の 3 分以内での分離
- 既存の LC-MS/MS 分析法より経済的な代替分析法
- 既存の LC ワークフローへ容易に統合できる質量検出
- UV 吸収の弱い化合物の定量
- 内部標準物質の追加コストを必要としない、簡単なサンプル調製
- 優れた回収率と再現性

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class システム
ACQUITY QDa® 検出器
ACQUITY UPLC BEH Amide カラム
Sep-Pak® シリカカートリッジ
MassLynx® ソフトウェア
Empower® 3 ソフトウェア

キーワード

メラミン、シアヌル酸(CA)、
ジシアンジアミド(DCD)、
DCD、質量検出、ミルクの分析、
ミルクのスクリーニング、タンパク質汚染

はじめに

メラミンおよびシアヌル酸(CA)は過去の様々な食品中のタンパク質汚染[1]に関連した窒素を豊富に含む低分子化合物です(図 1)。メラミンとシアヌル酸は個別には毒性はありませんが、組み合わせによって水素結合を介した付加化合物メラミンシアヌレートを形成することがあり、内臓不全を引き起こし死に至る可能性のある鋭利な結晶を生成します[2]。同様の化合物のジシアンジアミド(DCD)は放牧された家畜の環境への影響を最小化するために使用されており、ニュージーランドにおいて乳製品中に少量検出されました[3]。メラミンの公表されている基準値は、乳児用調製乳中では 1 mg/kg で、他の食品や動物飼料中では 2.5 mg/kg です。これらの値は、メラミンの耐容一日摂取量(TDI)、その類縁体は体重(bw) 1kg あたり 0.64 mg に基づき設定されています[4]。最近、より厳格なメラミンおよびその類似体の耐容一日摂取量(TDI)の体重 1kg あたり 0.2 mg が設定されました[5]。ジシアンジアミド(DCD)には、欧州食品安全庁は体重 1kg あたり 1 mg を設定しています[6]。これらの化合物は非常に高い極性をもっているため、一般的に逆相分離はこれらの分析には利用できません。現在の分析法では、主に MS/MS 検出と HILIC カラムあるいはイオンペア試薬[7]を組み合わせて使用します。

このアプリケーションノートではメラミン、シアヌル酸(CA)およびジシアンジアミド(DCD)の一貫したシンプルな定量を行うために、Waters® ACQUITY QDa 検出器と ACQUITY UPLC H-Class システムを組み合わせた分析法を紹介します。

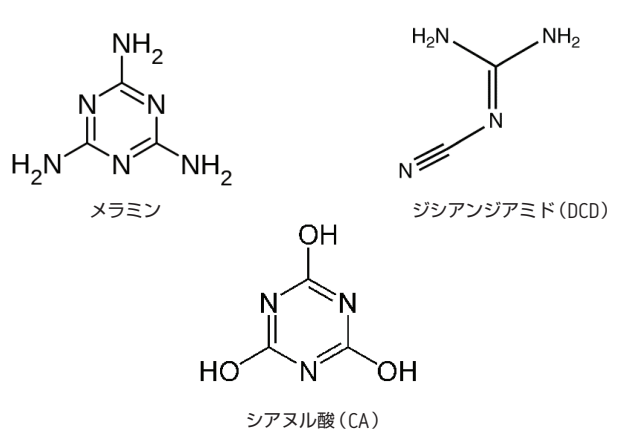

図 1. メラミン、シアヌル酸(CA)およびジシアンジアミド(DCD)の構造

実験条件

LC 条件

LC システム： ACQUITY UPLC H-Class

データシステム：Empower 3

分析時間： 14.0 分

カラム： ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 µm、2.1 ×150 mm

カラム温度： 35 ℃

移動相 A： 10 mM ギ酸アンモニウム 0.125% ギ酸含有 50% アセトニトリル水溶液

移動相 B： 10 mM ギ酸アンモニウム 0.125% ギ酸含有 90% アセトニトリル水溶液

流速： 0.6 mL/ 分

注入量： 5 µL

	時間（分）	流速（mL/分）	%A	%B
1.	Initial	0.6	2	98
2.	3.0	0.6	2	98
3.	3.5	0.6	98	2
4.	4.0	0.6	98	2
5.	4.1	0.6	2	98
6.	14.0	0.6	2	98

標準品調製

メラミン、シアヌル酸およびジシアンジアミドのそれぞれ 1000 mg/L の標準溶液は水で調製しました。これらから直ちに 2 mg/L メラミン、100 mg/L シアヌル酸および 100 mg/L ジシアンジアミドの混合溶液を水で調製しました。この標準液を 90% アセトニトリル水溶液で 100 倍希釈することで、20 µg/L メラミン、1000 µg/L シアヌル酸および 1000 µg/L ジシアンジアミドの標準溶液を調製しました。この標準溶液を、表 1 に記載された濃度の検量線を作成するために 90% アセトニトリル水溶液で 9 段階に希釈しました。

MS 条件

MS システム： ACQUITY QDa（Performance）

イオン化モード： ESI+/-

キャピラリー電圧： 0.8 kV ポジティブイオン、0.6 kV ネガティブイオン

プローブ温度： デフォルト（600 ℃）

ソース温度： デフォルト（120 ℃）

メラミン

SIR： *m/z* 127.1、ポジティブイオン

コーン電圧： 15 V

シアヌル酸

SIR： *m/z* 128.0、ネガティブイオン

コーン電圧： 10 V

ジシアンジアミド

SIR： *m/z* 85.1 ポジティブイオン

コーン電圧： 10 V

サンプリングレート：5 Hz

フルスキャン範囲： *m/z* 50 to 300

コーン電圧： 15 V

ポジティブおよびネガティブイオン、セントロイド

サンプル調製

1 g の粉ミルクまたは乳児用調製乳を 2% ギ酸水溶液 10mL に溶解しました。乳児用調製乳溶液 1 mL に 9 mL の 2% ギ酸水溶液を加えました。この溶液 1 mL に 9 mL のアセトニトリルを加え、よく混ぜ合わせました。タンパク質性の沈殿物は、20 分間静置後に 2233 g rcf で 20 分間遠心分離し沈降させました。上清 1mL を事前に 90% アセトニトリル 6mL で調整した Sep-Pak 6 cc シリカカートリッジ（p/n 186004616）に注入しました。カートリッジから 90% アセトニトリル 4mL で溶出させ、溶出液を分析しました。粉ミルクおよび乳児用調製乳（粉末状、液体状、牛乳由来および大豆由来）の 5 つのサンプルを分析に用いました。

添加回収試験は 1 g（液体状の乳児用調製乳）に 1 mg/L メラミン、20 mg/L シアヌル酸およびジシアンジアミドを添加し行いました。これを上述の 5 つのサンプルに対して行いました。それぞれのサンプルは、上述の試料調製プロトコールで調製しました。回収率を表 2 に記載しました。

標準品	メラミン	シアヌル酸	ジシアンジアミド
1	20.0	1000.0	1000.0
2	10.0	500.0	500.0
3	5.0	250.0	250.0
4	4.0	200.0	200.0
5	2.0	100.0	100.0
6	1.0	50.0	50.0
7	0.5	25.0	25.0
8	0.4	20.0	20.0
9	0.2	10.0	10.0

表 1. 検量線作成に用いた標準溶液の濃度（μg/L）

標準品	メラミン	シアヌル酸	ジシアンジアミド
乾燥粉ミルク	85	105	98
乳児用調製乳 粉末状、牛乳由来	103	123	105
乳児用調製乳 粉末状、大豆由来	75.0	113	105
乳児用調製乳 液体状、牛乳由来	99	119	112
乳児用調製乳 液体状、大豆由来	91	115	97

表 2. 5 つの異なるマトリクスにおけるそれぞれの化合物の添加回収率 メラミン 1 mg/L、シアヌル酸およびジシアンジアミド 20 mg/L を添加

結果および考察

分析法開発

このアプリケーションノートの 3 化合物を分離するためには、HILIC は理想的な手法です。2 つの異なる HILIC カラム BEH HILIC カラムおよび BEH Amide カラムを用いました。図 2 に非保持マーカーとして使用したアセナフテンとともに両方のカラムにおける化合物の保持を比較して示しました。図 2A に示すように、シアヌル酸とジシアンジアミドは HILIC カラムの非修飾 BEH 粒子ではほとんど保持しませんでした。ACQUITY UPLC BEH Amide カラムのトリファンクショナルのカルバモイルリガンドは目的の化合物の保持を非常に改善した（図 2B）ため、このカラムを分析に用いました。図 2B に示すように、3 つの化合物の優れた分離が達成されました。メラミンは 3 化合物の中で最も保持が強いですが、3 分以内に溶出しました。

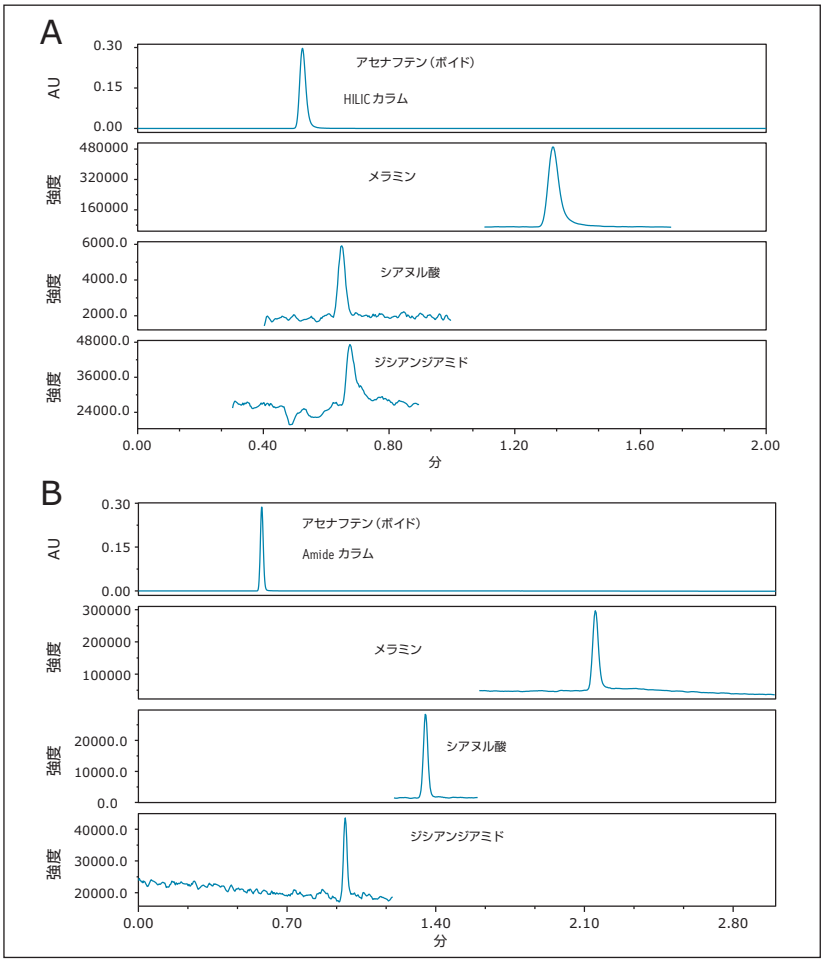

図 2A. ACQUITY UPLC BEH HILIC カラム（2.1×150 mm）を用いたメラミン、シアヌル酸およびジシアンジアミドの SIR クロマトグラム
最初のクロマトグラムはアセナフテンの 280 nm の UV クロマトグラムで、アセナフテンはこのカラムには保持されないため、カラムのボイド容量を示しています。

図 2B. ACQUITY UPLC BEH Amide カラム（2.1×150 mm）を用いたメラミン、シアヌル酸およびジシアンジアミドの SIR クロマトグラム
最初のクロマトグラムはアセナフテンの 280 nm の UV クロマトグラムで、アセナフテンはこのカラムには保持されないため、カラムのボイド容量を示しています。

図 3 は、標準溶液 1 の UV マックスプロット * とそれぞれの化合物（20 µg/L メラミン、1000 µg/L シアヌル酸およびジシアンジアミド）の SIR クロマトグラムを示しています。図 3 の UV トレースでは、ジシアンジアミドだけが強く検出されています。これらの化合物に対する質量検出の有用性を示した SIR チャネルにおいては、3 つの化合物すべてが強いシグナルを示しました。

クロマトグラフィー法を評価するために、サンプルマトリックスの例として、市販の 5 つの異なるサンプル（脱脂粉乳、牛乳由来の粉末状乳児用調製乳、大豆由来の粉末状乳児用調製乳、牛乳由来の液体状乳児用調製乳および大豆由来の液体状乳児用調製乳）を購入しました。これらのサンプルの分析後、メラミンと同じ保持時間で溶出される未知化合物がサンプル中に存在することが明らかになりました。この化合物はメラミンの溶出直後の凹みとして SIR クロマトグラムにあらわれました。原因をさらに調査するために、フルスキャン MS データを SIR クロマトグラムと一緒に取得しました。この化合物は *m/z*104.1 を示し（データ省略）、分析したすべてのマトリックス中に存在することがわかりました。メラミンのレスポンスの抑制を避けるために、Sep-Pak シリカカートリッジを使用した精製を行いました。この方法の有効性を、化合物を添加した乳児用調製乳に対して Sep-Pak カートリッジによる精製の有無によって比較し、図 4 に示しました。

図 4A に精製なしの化合物を添加した乳児用調製中のメラミンの SIR クロマトグラムを示しています。メラミン溶出後のベースラインの凹みは、前述したようにシグナルの著しいイオン化抑制を示唆しています。図 4B の *m/z* 104.1 の抽出イオンクロマトグラムは、イオン化抑制を引き起こす化合物のピークを示しています。図 4B におけるクロマトグラムの強度は、この化合物が目的の化合物よりもはるかに高いレベルで存在することも示しています。図 4C のように、精製後はメラミン SIR クロマトグラムのベースラインは影響を受けていません。図 4D は、精製後の *m/z* 104.1 の抽出イオンクロマトグラムを示しています。

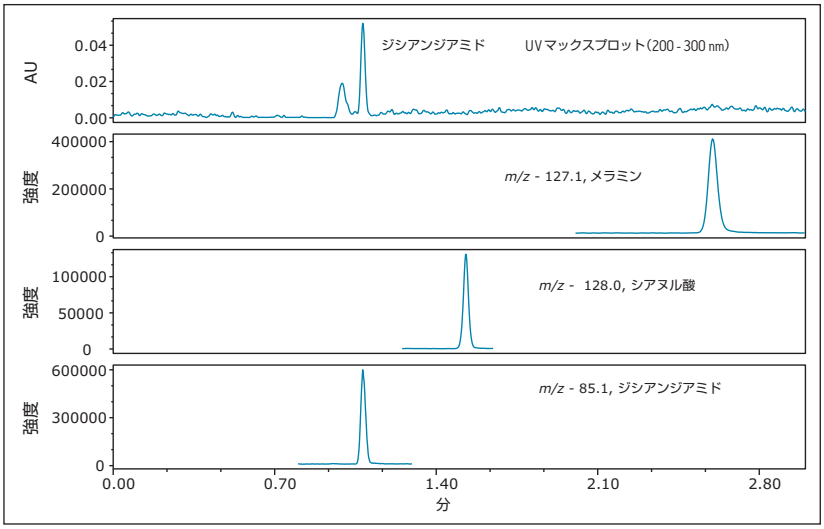

*図 3. 標準溶液 1 の UV マックスプロット * とメラミン、シアヌル酸およびジシアンジアミドの SIR クロマトグラムの重ねがき*

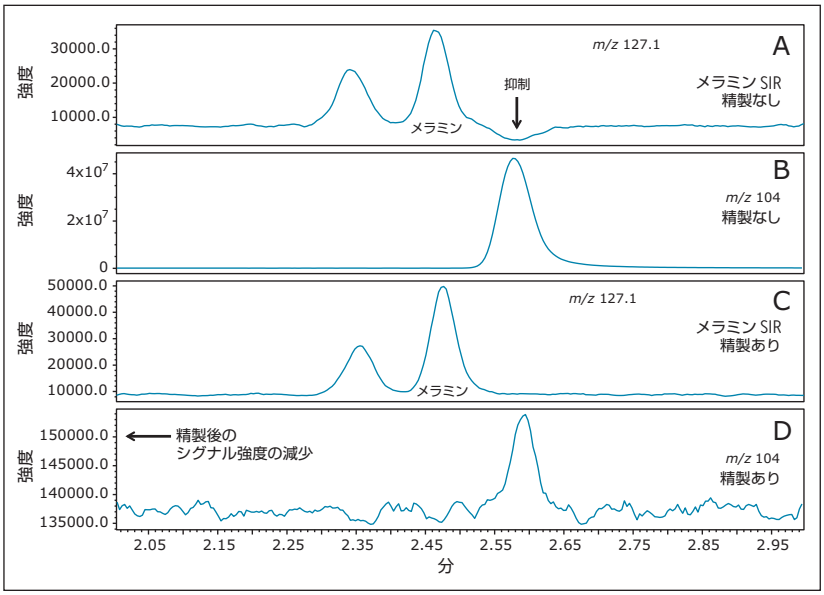

図 4. メラミンを添加した乳児用調製乳の Sep-Pak シリカカードリッジによる精製の有無の比較

* UV マックスプロットは 3 次元 PDA データに由来する各データポイントの最大吸光度をプロットした 2 次元クロマトグラムプロットです。

m/z 104.1 のレスポンスは、精製によって約 1/250 になりました。この分析法開発の調査と改善は、目的の化合物の選択された SIR チャンネルとフルスキャンを同時取得することよって可能になりました。SIR 分析は目的の化合物をスクリーニングするために必要な最低濃度での高感度定量を実現します。そして、フルスキャン MS データは、マトリックス中で分析法開発および分析法の変更のための貴重な情報を提供しました。

サンプル分析

それぞれの化合物の検量線を図 5A-C に示します。図 5 に示すように、検量線の範囲は 3 つ化合物が直線性を示す異なる濃度範囲を選択しました。すべての化合物の回帰は残差 20% 以下で 0.996 以上でした。

添加の有無、脱脂乳粉末、液体状牛乳由来の乳児用調製乳、粉末状大豆由来の乳児用調製乳の比較を、図 6 に示します。図 6A ではメラミンが 1 mg/L 添加されています。シアヌル酸（図 6B）およびジシアンジアミド（図 6C）は 20 mg/L（図 5 の検量線の範囲内）で添加されています。メラミン（図 6A、保持時間 2.5 分）のピークの前の強度の低いのピークは、牛乳由来乳児用調製乳サンプルにおいて明らかでしたが、メラミンのピーク検出を妨害しませんでした。

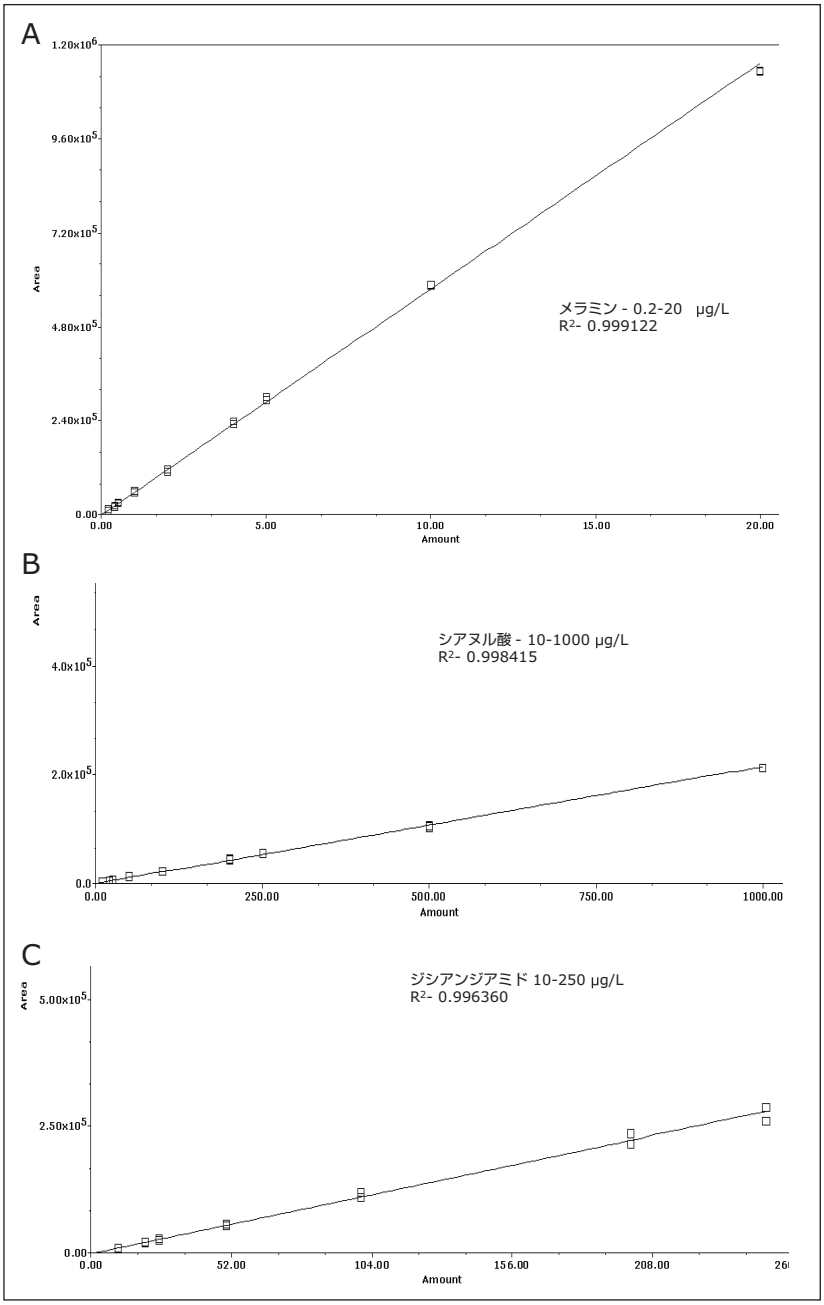

図 5. メラミン（A）、シアヌル酸（B）およびジシアンジアミド（C）の検量線

回収率を評価するために、添加した量と図 5 の検量線を用いて定量値を比較しました。前述した濃度で 5 つの異なるマトリックスに添加した際の回収率を、3 ページの表 2 に示しました。回収率は、すべての検体で 75%から 123%でした。化合物を添加した液体状大豆由来乳児用調製乳の 7 回繰り返し注入について再現性を評価しました。保持時間と定量値の両方の% RSD をそれぞれの化合物について、3 ページの表 3 に示します。

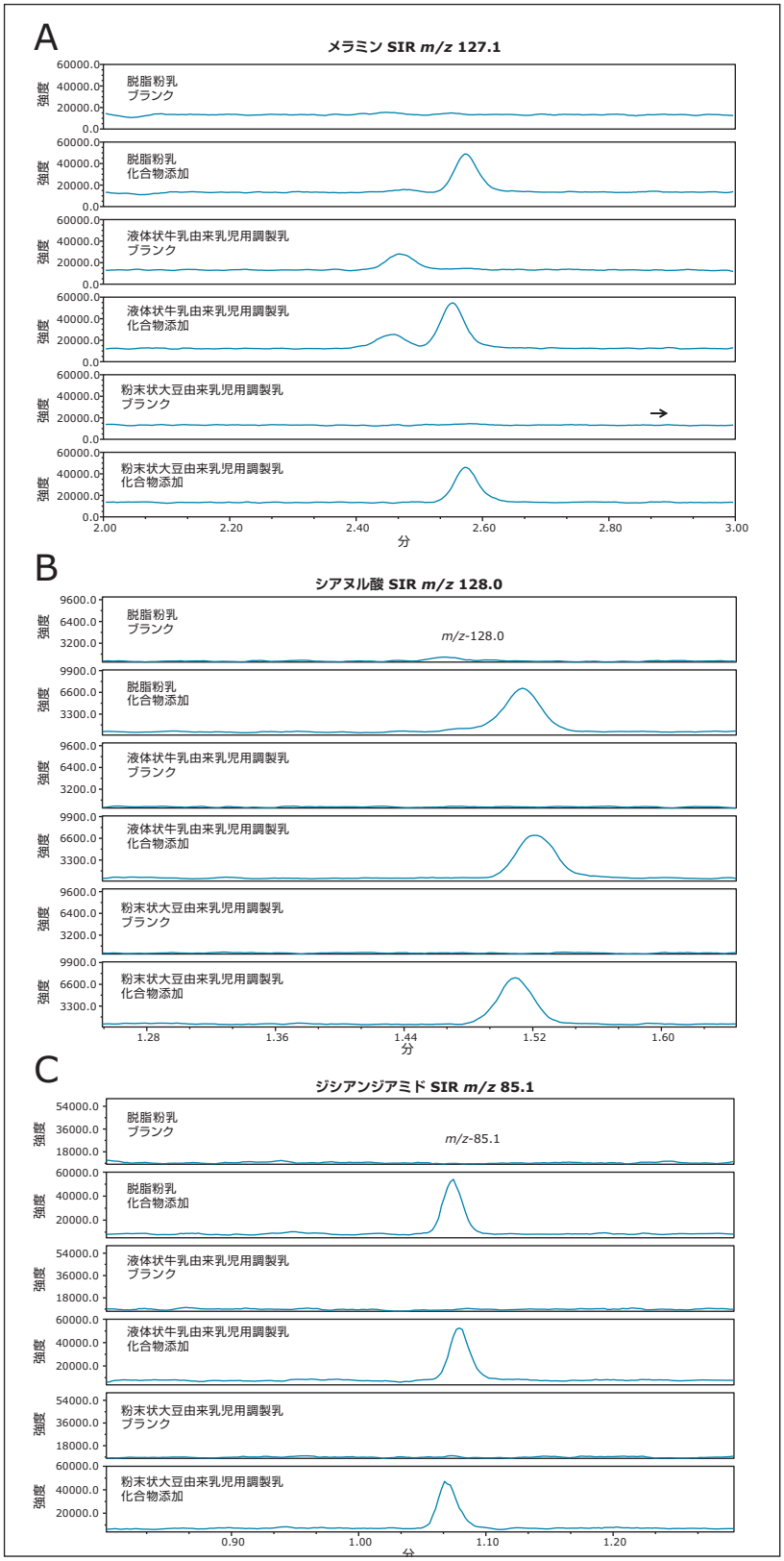

図 6. 脱脂粉乳、液体状牛乳由来乳児用調製乳および粉末状大豆由来乳児用調製乳のブランクと化合物添加（1 mg/L メラミン、20 mg/L シアヌル酸および 20 mg/L ジシアンジアミド）後の SIR の比較
(A) SIR クロマトグラム（m/z 127.1、メラミン）
(B) SIR クロマトグラム（m/z 128.0、シアヌル酸）
(C) SIR クロマトグラム（m/z 85.1、ジシアンジアミド）

結論

乳児用調製乳中のメラミン、シアヌル酸およびジシアンジアミドの迅速なスクリーニング分析法が開発されました。5 つのマトリクス添加分析において 3 つの化合物の回収率は 75% から 123% でした。ACQUITY QDa 検出器、BEH Amide カラムと ACQUITY UPLC H-Class の組み合わせは以下のメリットを提供します。

- 高極性で保持が困難な化合物の保持
- 3 分以下での迅速なベースライン分離
- シンプルな前処理精製
- 大がかりな質量分析のトレーニングを必要としない、高選択性で高感度な質量検出

参考文献

1. Import alert #99–29, “Detention without physical examination of all vegetable protein products from China for animal or human food use due to the presence of melamine and/or melamine analogs”. U.S. Food and Drug Administration. 27 April 2007.
2. *Culprit in pet food deaths may be combination of contaminants*. Michigan State University. November 29, 2007.
3. *Government downplays DCD risk*. News NZ. January 27, 2013.
4. US FDA, Interim Melamine and Analogues Safety/ Risk Assessment May 25, 2007, http//www.cfsan.fda.gov/~dms/melamra.html
5. *The EFSA Journal* 2010, 8, 1573.
6. *The EFSA Journal* (2004) 36, 1–6.
7. Draher J et al. Validation of a rapid method of analysis using ultrahigh-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry for nitrogen-rich adulterants in nutritional food ingredients *Journal of Chromatography A*. 1373:106–113; 2014.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY UPLC、ACQUITY QDa、ACQUITY、UPLC、Sep-Pak、MassLynx、Empower および Empower は The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年2月 720005397JA PDF