

Application News

No. C164

LC/MS

LDTD-MS/MS による粉ミルク中メラミンの超高速分析

メラミンは、粉ミルクやペットフードへの人為的な混入で、大きな社会問題となりました。食品中に高濃度に含まれた場合、メラミン製造時に生じるシアヌル酸と合わせて腎臓結石や腎不全を引き起こす原因となります。一般にメラミンを添加する際には、製品の偽装を目的とすることが多く、添加される量は、非常に高濃度となります。このような偽装を水際で食い止めるには、簡単な試料調製との組み合わせによる高速スクリーニング分析が求められています。粉ミルク中のメラミン分析法としては、夾雑成分を除去する前処理の後、LCMS および GCMS を用いた手法が広く報告されています。本稿では粉ミルク中のメラミンを分析するにあたり、LDTD (Laser Diode Thermal Desorption) イオンソースを LCMS-8060 と組み合わせることで、カラム分離を行わない超高速分析を実施しました。

LDTD イオンソースはカナダのPhytronix社 (<https://phytronix.com/>) が開発した超高速スクリーニング分析用のイオンソースです。レーザー照射による試料の気化、その後の APCI によるイオン化によって、わずか数秒での質量分析を可能にします。試料は 96 ウェルプレートにアプライすることで、10 枚のプレートを連続して分析することが可能です。LDTD イオンソースと当社 LCMS-8060 の組み合わせでは、LCMS-8060 に LDTD イオンソースを接続したまま、カラム分離を用いた LC/MS 分析と LDTD による直接分析をメソッドファイルをロードするのみで、それぞれ使い分けことができます (図 1)。これにより、LCMS-8060 で分析対象となる化合物の MRM 最適化を行い、決定した MRM トランジションを使って、LDTD による超高速分析を行うことが可能となります。またその逆に、LDTD による超高速分析により多検体の分析スクリーニングを行い、その結果を受けて特定の試料に対して LC/MS 分析を行うこともできます。このように LDTD イオンソースと LCMS-8060 の組み合わせはその目的に合わせて、二つの全く異なる分析法をスイッチして使用することができます。

本稿では、LDTD イオンソースを接続して、DUIS (Dual ion source, ESI と APCI) によるメラミンの MRM 最適化を行い、得られた MRM トランジションを LDTD-MS による超高速分析に用いました。また LDTD-MS による超高速分析には、粉ミルク中にメラミンを添加したものを試料として、液々抽出によるメラミンの回収後、LDTD イオンソースと LCMS-8060 を組み合わせた質量分析システムを使用しました。ここでは、LCMS と LDTD-MS という二つの分析システムを切り替えて粉ミルク中のメラミンを分析した例をご紹介します。

■ LDTD システムを接続した LC-MS による MRM 最適化

最初にメラミンの標準品を用いて DUIS モードによる MRM の最適化を行いました。最適化における LC 条件は一般的な FIA (Flow Injection Analysis) による MRM 最適化条件にて行いました。図 2 は DUIS モードでメラミンを最適化した際に得られた MS/MS スペクトル (CE:-25V) を示します。この条件で確認された MRM トランジション ($m/z126 > 85$ 、 $127 > 68$ 、 $127 > 43$) のうち、LDTD-MS 分析でバックグラウンドが低かった MRM トランジション ($m/z127 > 68$) を使って、LDTD-MS による粉ミルク中のメラミン分析を行いました。

T. Nakanishi

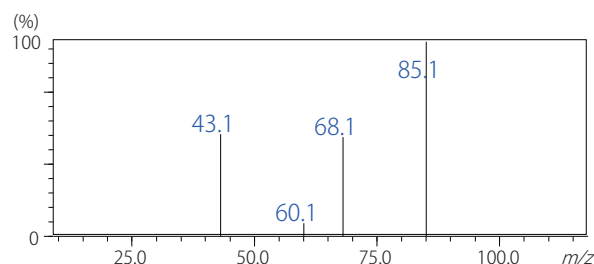
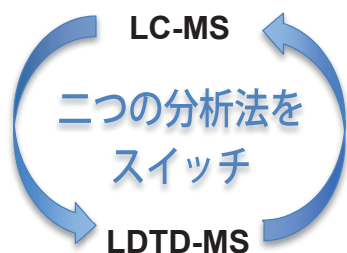


図2 DUIS モードにおけるメラミンの MS/MS スペクトル



ESI、APCI、DUIS の 3 つのイオン化法を使い分けながら、LDTD による超高速分析をスムーズに始めるために対象成分の MRM 最適化を行ったり、複雑な分析試料の場合には LDTD 分析後に、再び LC/MS による詳細解析を行うことも可能です。

LDTD-MS 用の 96 ウェルプレートへの試料の簡単なアプライから、LDTD-MS による複数成分への超高速分析 (4 秒でのイオン化) が可能です。

図1 LC-MS と LDTD-MS による二つの分析法

■粉ミルク添加メラミンの抽出

市販の粉ミルク 125 mg を秤量して、1.5 mL のエッペンドルフチューブに移します。次に 0.5 mL の超純水および 0.5 mL のアセトニトリルを加えて、1 分間しっかりと攪拌しました。次にあらかじめ調製しておいた 0、5、10、25、50、100、500、1000 $\mu\text{g/mL}$ のメラミン溶液を 12.5 μL ずつ、粉ミルク懸濁液に加えていきます。これは粉ミルク中濃度として、0、0.5、1、2.5、5、10、50、100 ppm に相当します。添加したメラミンが十分に混ざるように、さらに 1 分間しっかりと攪拌しました。遠心分離 (14,000 g、室温、5 min) により粉ミルク成分を沈殿させ、メラミンを含む 200 μL 上清を回収して新しいエッペンドルフチューブに移します。次に 200 μL 炭酸ナトリウム緩衝液 (飽和 NaCl、pH 10) を加えてしっかりと攪拌し、さらに 1 mL の酢酸エチルを加えて十分に攪拌しました。水層と有機層に分かれますので、遠心分離を行い、メラミンが含まれる有機層から 4 μL を LazWell プレート (96 ウェル) に分注して乾燥させました。LazWell プレートを LDTD イオンソースにセットして、各試料に対するバッチ分析を行いました。

表 1 LDTD-MS の分析条件

LDTD 分析条件	
レーザーパターン	: 65 % レーザーパワー、2 秒
ガス流量	: 3.0 L/min
MS 分析条件	
モード	: MRM (pos)
インターフェイス	: APCI
DL 温度	: 250 $^{\circ}\text{C}$
ヒートブロック温度	: 400 $^{\circ}\text{C}$

■粉ミルク添加メラミンの LDTD-MS 分析

LDTD-MS 分析条件を表 1 にまとめました。図 3 に示したのは、粉ミルクに添加したメラミンの MRM クロマトグラム (粉ミルク中濃度として 0.5、5、50 ppm 相当) です。LDTD イオンソースによって、わずか 6 秒以内 (0.1 分以内) でメラミンがイオン化されていることがわかります。また各濃度のメラミンを添加した試料を $n=3$ で分析したところ、図 3 に示すように良好な再現性を示すことが確認できました。このことは、LDTD-MS 分析による超高速分析が、圧倒的なスループットを持ち、かつ、LCMS 分析に匹敵する高い再現性を確保した定量分析が行えることを示しています。次にメラミンを添加した各濃度試料の分析結果をもとに、各添加濃度に対するピーク面積値をプロットしました (図 4)。この分析結果からは、 $R^2=0.998$ の直線性が確認できました。これらの結果から、粉ミルク中のメラミンといった夾雑物を多く含む試料においても、高い再現性・直線性をともなった超高速定量分析が LDTD-MS によって行えることがわかります。

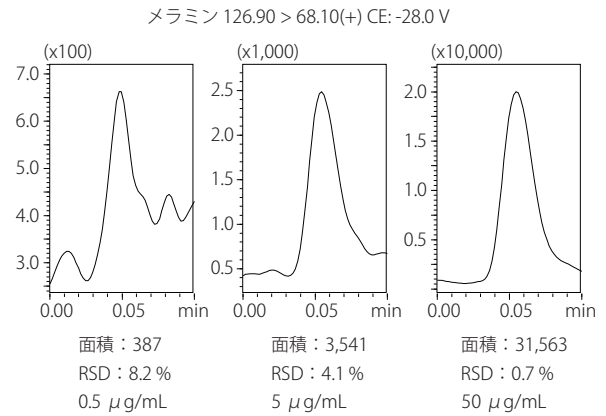


図 3 粉ミルクに添加したメラミンの MRM クロマトグラム

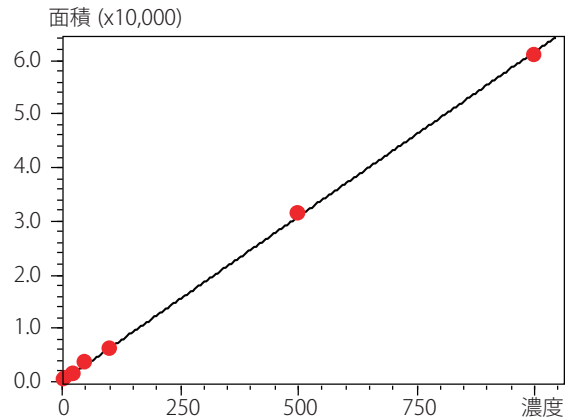


図 4 粉ミルクに添加したメラミンの直線性

本稿では、LCMS-8060 の DUIS モードによる MRM 最適化を行った後、粉ミルクに添加したメラミンに対して LDTD-MS による超高速分析を行い、その再現性と直線性の高さを確認しました。このように LCMS-8060 と LDTD イオンソースの組み合わせは、分析目的に応じて簡単に分析システムを切り替えることができるため、多成分の最適化を LCMSで行ったり、あるいは LDTD による超高速な簡易スクリーニング分析の結果を受けて、複雑な分析試料への LCMS 分析を実施するといった、二つの特徴的な分析法を使い分けることができます。