

食品中のメラミン分析のための Agilent トータルソリューション

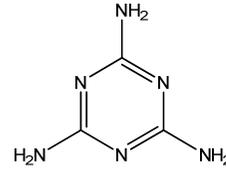


本資料の内容

- メラミン分析の背景
- 分析ニーズに応じて、Agilentが提供する一連の分析ソリューション
- Agilentの幅広い製品ラインナップが実現した分析メソッド
- 参考情報



メラミン問題の背景



メラミンは多くの窒素分を含有する化合物：たんぱく質が豊富であるかのように化学的に偽装し、品質チェックを不正にパスするために食品に添加された

- ◆2007年3月、アメリカ合衆国全土にわたり、輸入 **ペットフード** に添加されていたメラミンが原因とされる犬や猫の腎障害が発生
- ◆中国において、メラミンが不正に添加された **粉ミルク** が死亡事故や健康障害を引き起こし、再びニュースとなった
- ◆日本やヨーロッパにおいて、汚染原料から製造された加工食品からも検出され、**世界的な問題** となっており、広範囲にわたるメラミン分析が世界的に行われ始めた。さまざまな政府機関がプレスリリースを発表し、分析ラボは測定ビジネスを開始している



メラミン分析メソッドの世界動向

- **US FDA (米国食品医薬品局):** ペットフード問題以降、GC/MS, LC メソッドが発行されている。LC/MS を用いたリサーチメソッドも 2007年に出されている。これらのメソッドのアップデートはされていない(後記:2008年10月に更新あり)
- **China GB (中国国家標準):** ミルクと乳製品についての国家規格メソッドが最近発行された。GC/MS, LC, LC/MS/MS等をベースとしたメソッド
- **ヨーロッパ、アジアおよびその他の地域:** 開発中であり、パフォーマンスベースのメソッド(例:EU)となることが期待されているが、緊急事態のためFDAもしくは China GB メソッドに続く公算が大きい

... ほとんどのメソッドがアジレントの製品/消耗品をベースに開発されています



Agilent のトータルソリューションの位置づけ

メラミン分析において、最も幅広いソリューション群: 最高の感度、生産性、対コスト効果など、分析目的に応じて最適な手法を選択できます:

- ◆ **GC/MS メソッド**: 迅速なスクリーニングおよび確認分析
- ◆ **LC メソッド**: ルーチンの定量分析
- ◆ **LC/MS/MS**: 最も高感度で高選択性をもたらすスクリーニング、確認、定量分析
- ◆ **SampliQ SCX 混合相ポリマー SPE カートリッジ**がミルクマトリクスを効果的に除去

Agilent の革新的な技術が、分析ラボの生産性向上と素早い結果をもたらす:

- ◆ **バックフラッシュ**: 革新的なキャピラリー・フロー・テクノロジーを用いたバックフラッシュにより、サンプル前処理の必要性を最小限にし、GC分析時間(サイクルタイム)を1/5に短縮することも可能
- ◆ **LC/MS/MS** :トリプル四重極LC/MSを用いると、高感度で高選択性なメラミン分析が可能
- ◆ **幅広いカラムのラインナップ**:さまざまな分析ニーズに対応



GC/MS メソッド



**FDA, China GB が既にAgilentのシステムを
ベースに標準メソッドを開発**

**キャピラリー・フロー・テクノロジーを用いた
応用メソッドで、分析時間と前処理時間を短縮**



GC/MS メソッド

- ◆ GC/MSはさまざまなマトリクス中における、メラミンおよび関連物質の有無のスクリーニングに用いられる

- ◆ US FDA 発行のメソッドに詳細手順が記述

<http://www.fda.gov/cvm/GCMSMelamine.htm>

2008年10月更新情報→ <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4423.html>

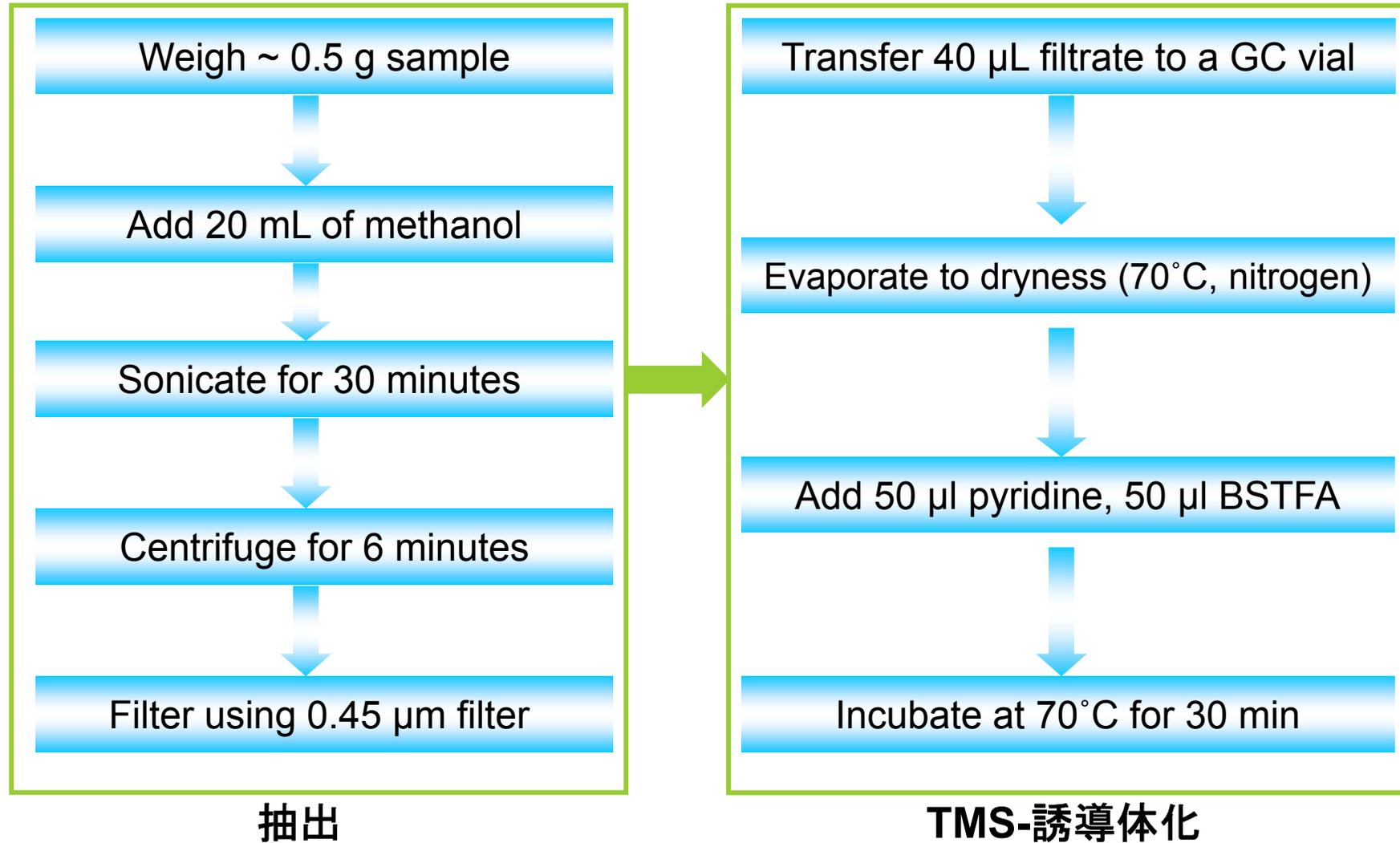
- ◆ サンプルはGC/MS分析前に誘導体化が必要

- ◆ 分析時間はサンプルマトリクスにより長くなることがある

- ◆ FDA および China GB はアジレントの機器および消耗品をベースにメソッドを開発



GC/MS サンプル前処理



GC/MS 分析条件:



GC

Inlet Temp EPC,	Split/Splitless @ 250 ° C
Injection Volume	1 µL, Spilt 3:1
Carrier Gas	Helium, Constant Flow Mode, 1.3 mL/min
Oven Program	75 °C (1 min); 30 °C /min to 300 °C (1 min)
Post Run	300 °C hold 5 min
Transfer Line	280 °C

MS

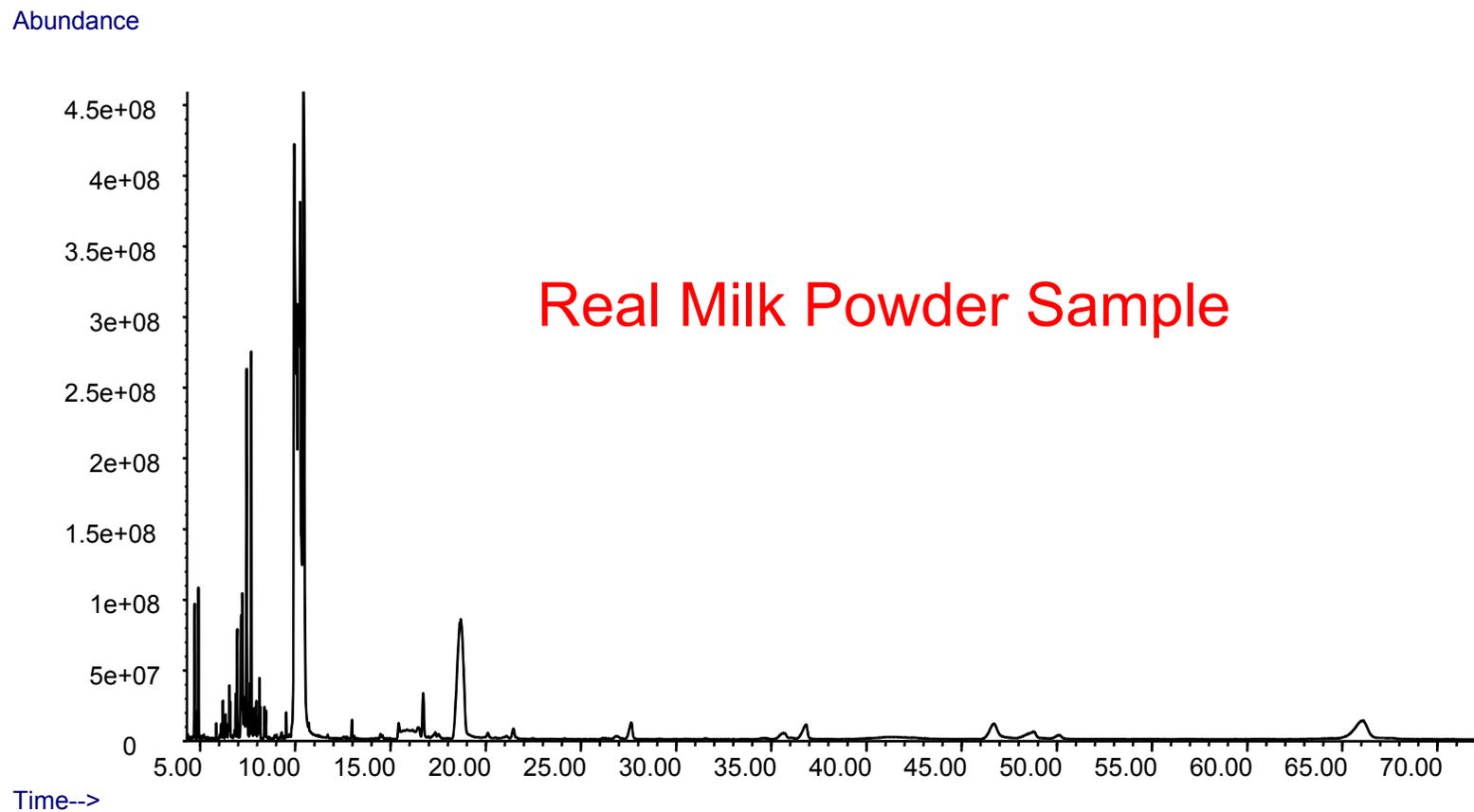
MS	EI, SIM/Scan
Solvent Delay	4.2 min
MS Temp	230 °C (Source); 150 °C (Quad)
Scan Modemass range	(40-450 amu)
SIM Mode Ion (melamine):	342, 327* , 171, 99; cyanuric acid: 345* , 330, 188)

オーダー情報:

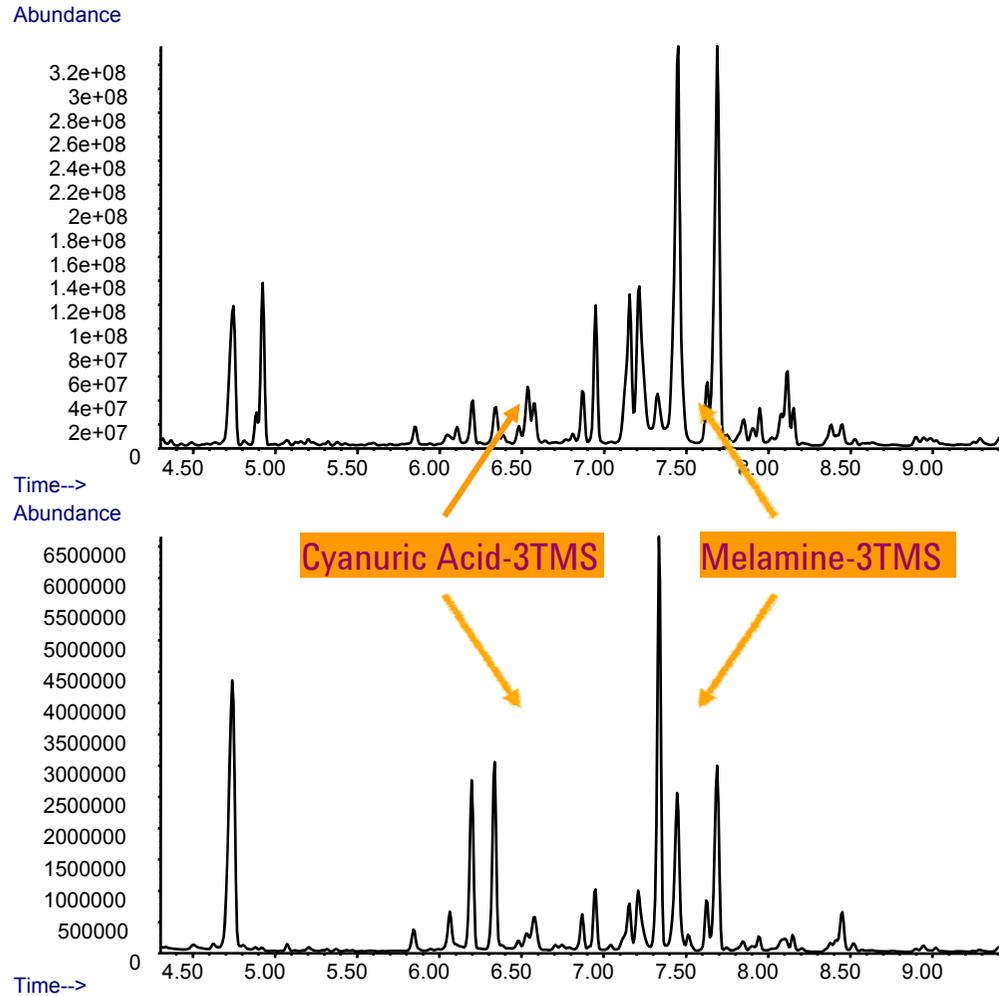
7890A/5975C、MSD ChemStation E.01.00 以降
Column: HP-5ms 19091S-433 30m × 0.25mm × 0.25µm
もしくは DB-5ms 122-5532 30m × 0.25mm × 0.25µm



GC/MS メソッドでのクロマトグラム

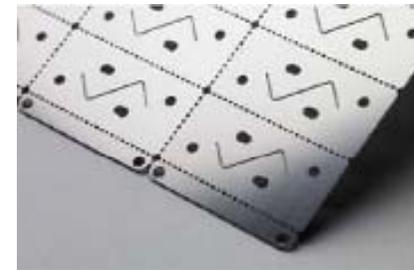


データ解析: SIM/Scanで確認分析と定量を同時に実施

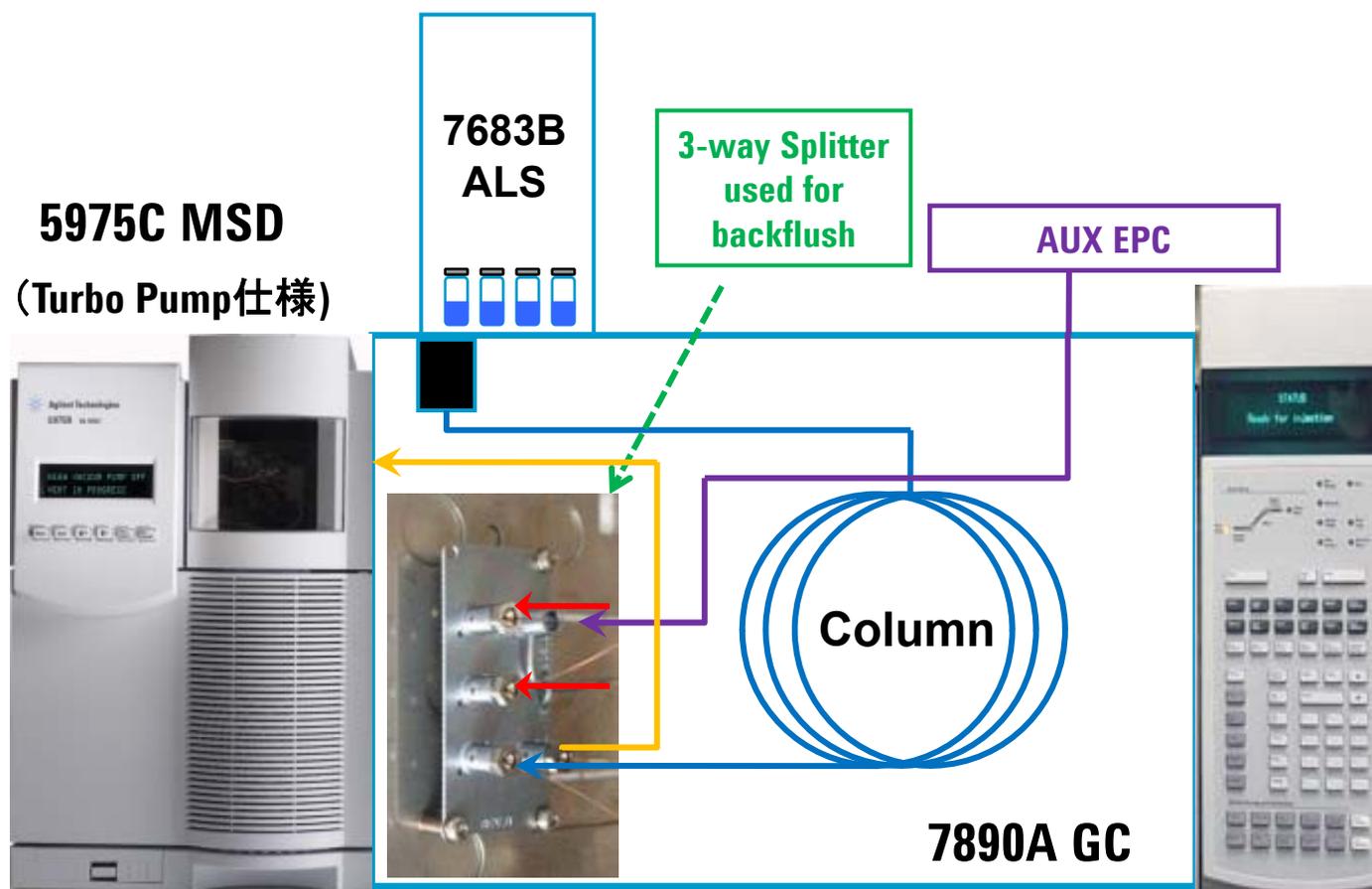


バックフラッシュを用いた応用 GC/MS メソッド

- バックフラッシュによりラボの生産性を向上
- FDA, China GB メソッドに準拠。さらに高速化
- Agilent の高信頼性、簡単操作のキャピラリー・フロー・テクノロジーによるバックフラッシュが、サンプル前処理の必要性を低減し、GC サイクルタイムを1/5に短縮



バックフラッシュ: GC/MS コンフィグレーション例



Ordering information:

FDA, China GB GC/MS でのコンフィグレーションにプラスして:

3-way Splitter: P/N G3183B + Aux EPC: G1530-63309

(バックフラッシュは、全てのメーカーアップ付キャピラリー・フロー・デバイスで可能。上記は一例です)

分析条件:

GC, MS パラメータ:

標準のGC/MS メソッドと同じ

バックフラッシュ パラメータ:

リストリクタ 0.71m × 180 μm id

カラム出口圧 2 psi (バックフラッシュは60 psi)

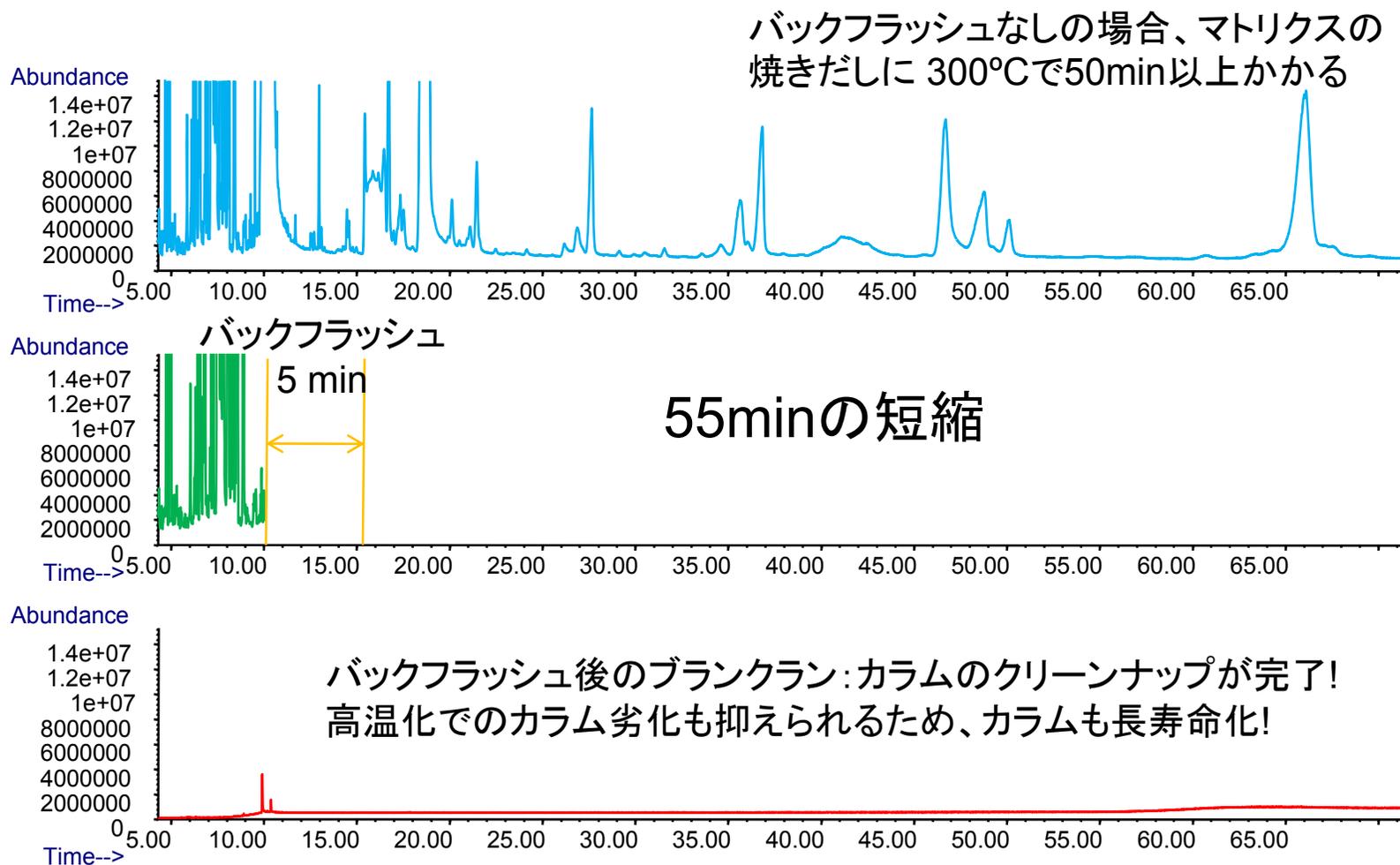
バックフラッシュ時間 5 min

Summary of Backflush Calculations			
Oven Temperature	Transfer Line Temperature		
300 °C	280 °C		
Detector	Maximum Flow	Allowable Pressure	Flow at Chosen Pressure
Vacuum	75	75.156	51.833
Backflush Pressure			
60 psi			
Inlet Pressure during Backflush		Backflush Flow to Inlet	Void Time
1 psi		3.2612 mL/min	0.14142 min
Void Volumes		Backflush Time	
9.1923		5 min	
OK Cancel Help			

バックフラッシュメソッドを
簡単に開発できるソフトウェア



バックフラッシュの利用で分析時間を1/5に短縮



GC/MS メソッドのまとめ

- メラミンおよび関連物質の迅速なスクリーニングおよび確認分析が可能
- SIM/Scan により、確認分析と定量が同時にできる
- バックフラッシュが分析時間を 75 min から 15 min に短縮
- バックフラッシュでサンプルマトリクスを除去し、SPEでのサンプルクリーンアップの必要性を最小限に抑える
- FDA および China GB の GC/MS メソッドは Agilent の機器およびカラムをベースに開発
- 応用メソッドは FDA, China GB メソッドに準拠し、生産性をさらに向上



SPE (固相抽出)によるサンプル前処理

Agilentは新しく SampliQ SCX SPE をリリースしました。
乳製品関連のサンプルマトリクス除去にもっとも有効な
選択肢の一つです。



標準的なLC と LC/MS/MS用の前処理



Step1:抽出

Milk, milk powder, yoghurt & ice-cream

Weight 2 g into 50 mL tube

add 15 mL trichloroacetic acid solution
+5mL acetonitrile

sonicate for 10 min, vortex 10 min,
Centrifuge at 4000 r/min 10 min

Filter using wet filter paper with
5% trichloroacetic acid in water

Step2: SampliQ 固相抽出

SampliQ cartridge Active:
using 5 mL methanol, 6 mL water

Load: 5 ml extract + 5mL purified water

Wash:
using 5 mL methanol and 5 mL water at 1 mL/min

Elute: using 5 mL
5% ammonium hydroxide in methanol

Collect:
dry under N₂ and dry, dissolve and filter

オーダー情報: SampliQ P/N: 5982-3236

前処理例の詳細: アプリケーションノート 5989-9949EN



HPLC メソッド

**China GBはAgilentのLCシステムを用いて、
標準的な逆相HPLCメソッドを開発した**

**Agilentで開発したイオン交換モードはミルク中の
メラミンを分析するChina GBのLC/MS/MSの
メソッドに準じている**



逆相LC (RPLC) – China GBメソッド

- ◆ 様々な夾雑物中のメラミンの含有を測定するルーチン的なメソッド
- ◆ FDAでも2007年に、小麦グルテン、ペットフード中のメラミンの定量用として逆相LCメソッドを報告
- ◆ 誘導体化の必要はないが固相抽出による前処理は必要



LC パラメーター- 標準的な逆相 LCメソッド



Column:	ZORBAX Rx C8
Buffer:	10 mM citric acid, 10 mM sodium octane sulfonate, adjusted to pH 3.0
Mobile phase:	15:85 buffer: acetonitrile
Flow rate:	1.0 ml/min
Injection volume:	10 μ L
Column thermostat:	40°C
Detection wavelength:	240 nm
Spectral collection:	200 – 400 nm
Run time:	10 min.



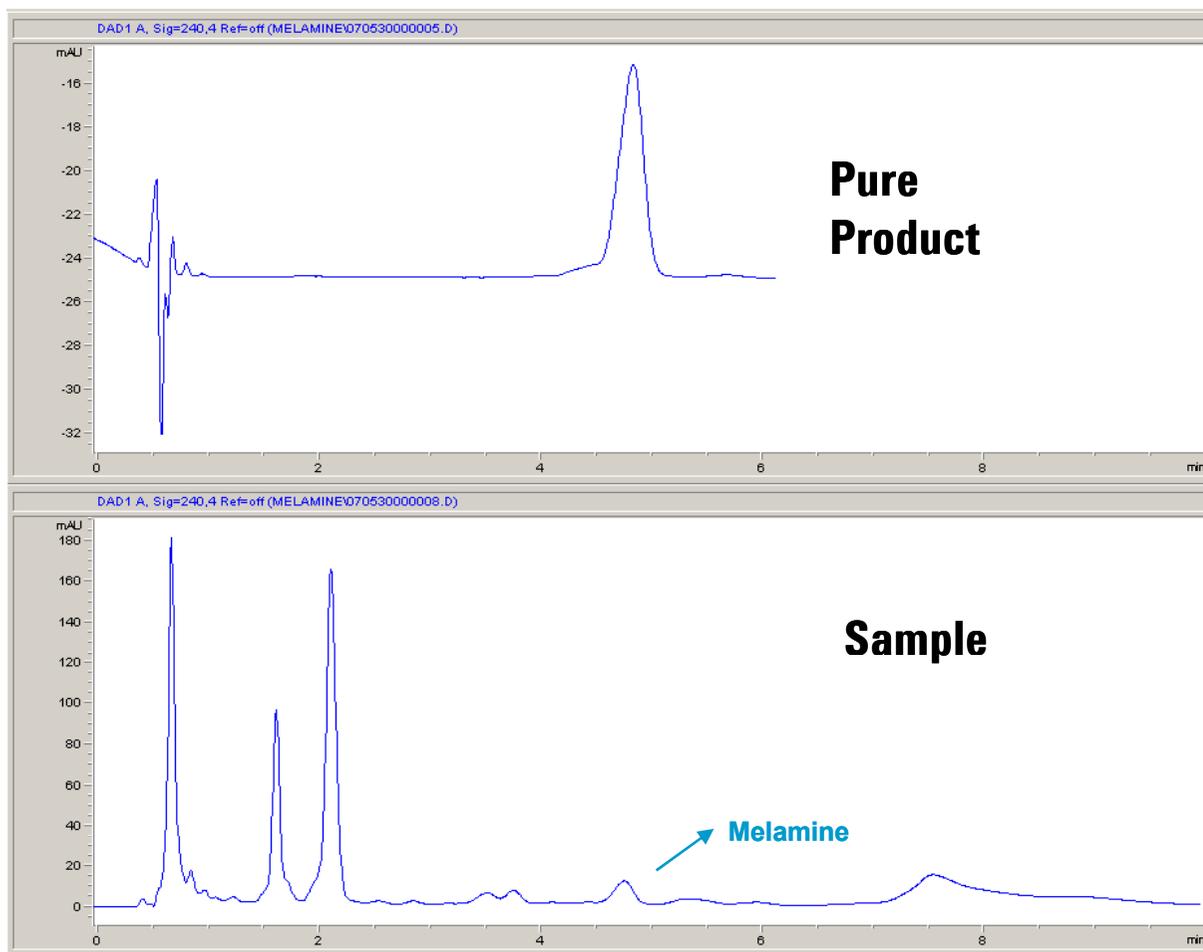
オーダー情報:

LC system: Agilent LC (1200 HPLC, RRLC or 1120 LC)

Column: ZORBAX Rx C8 (PN: 883967-901)



逆相LCによる分析結果



✓ China GBに準じた
メソッド

✓ 良好な分離が得られ、
定量可能

✓ イオンペア剤が必要—
LC/MSには適さない。
長い平衡時間が必要

その他のLCメソッド – イオン交換モード

- ◆ 牛乳や乳製品中のメラミンの有無やルーチン的な定量を簡便かつ迅速に行える
- ◆ China GBのLC/MS/MSメソッドへ適用可能
- ◆ China GBの標準メソッドではない。
- ◆ 逆相モードほど汎用的な分離モードではない



LCパラメータ – イオン交換モード



Column: ZORBAX 300SCX 4.6 × 150mm, 5µm
Part. No. 883952-704

Buffer: 50mmol/L ammonium formate solution,
adjust pH to 3.0 by formic acid

Mobile phase: 85:15 buffer: acetonitrile

Flow rate: 1.0 ml/min.

Injection volume: 10 µL

Column thermostat: 30°C

Detection wavelength: 240 nm



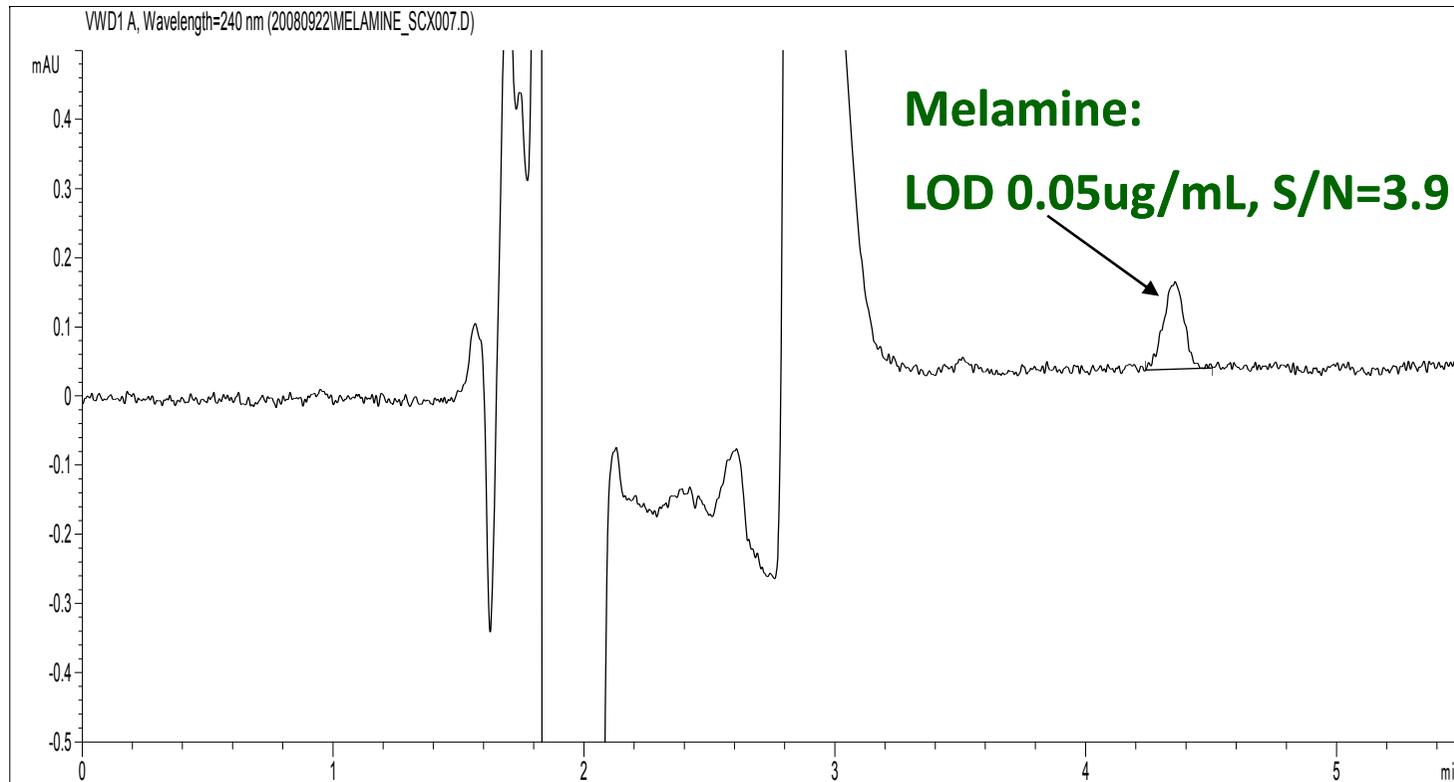
オーダー情報:

LC system: Agilent LC (1200 HPLC, RRLC or 1120 LC)

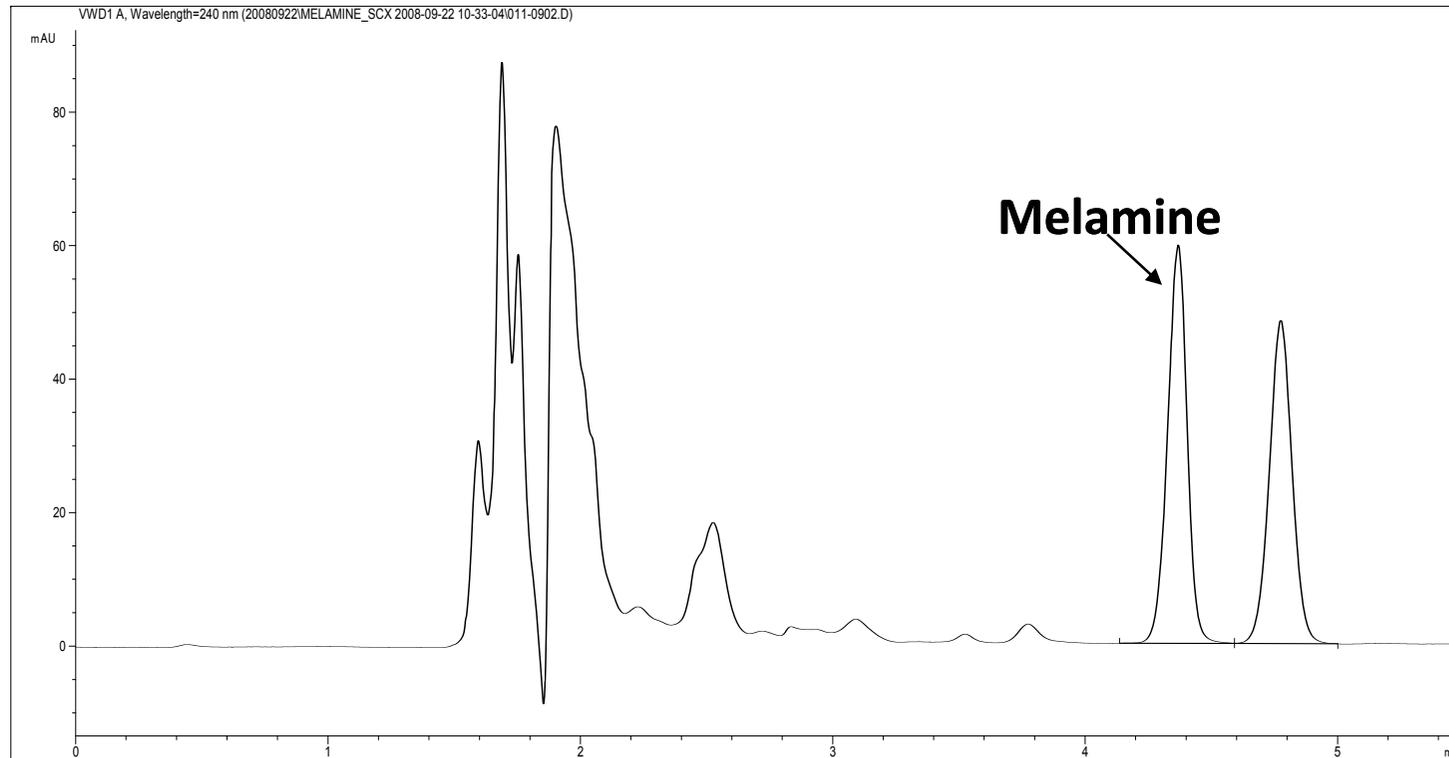
Column: ZORBAX 300SCX 4.6 × 150mm, 5µm
Part. No. 883952-704



イオン交換 LC モードによる分析結果



イオン交換LCモード – 牛乳中の夾雑物の影響



Note: 固相抽出による前処理なし

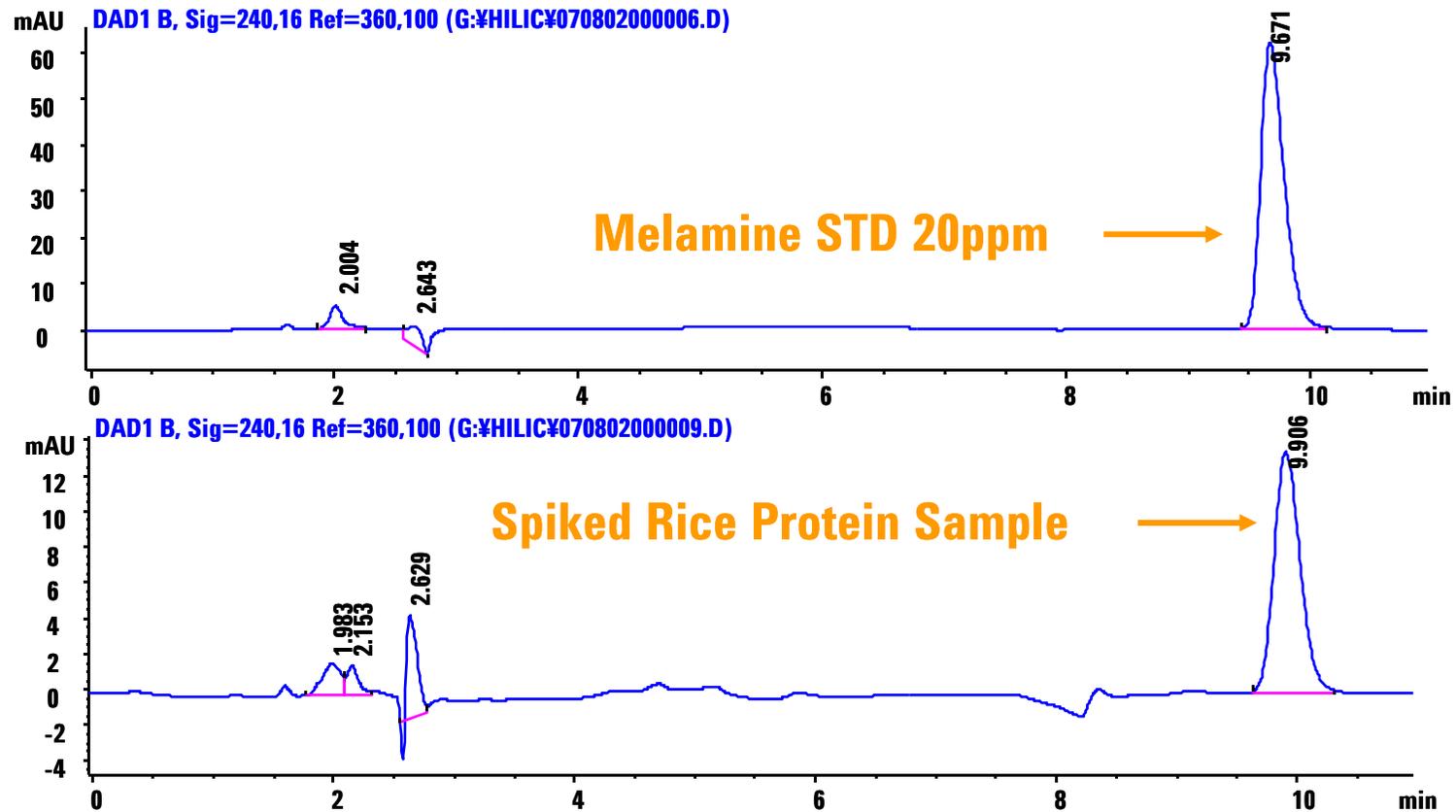
その他のLCメソッド – HILICモード

- ◆ FDAのLC/MS/MS のテストメソッドに適用可能
- ◆ イオンペア剤の使用の必要なし
- ◆ FDA、China GBの標準メソッドではない
- ◆ 逆相モードほど汎用的なLCモードではない

詳細はLC/MS/MSメソッドのセクションをご参照ください



HILICモードによる分析結果 - 米サンプル



注:LC-DAD-MS/MSシステムのDAD測定結果

HPLC メソッド まとめ

- ルーチン的な定量分析に適したLCメソッド
- 夾雑物の影響を抑えるために、固相抽出によるサンプル前処理が必要である
- China GBのメソッドは一般的な分離モードとカラムで行えるが、バッファにイオンペア剤を使用する必要がある
- Agilentでは、イオンペア剤を使用しないイオン交換モードのLC条件を開発した。乳製品中のメラミン含有の確認のため、China GBのLC/MS/MSメソッドへ適用可能である
- HILICモードは、イオンペア剤を使用することなく、メラミンとシアヌル酸を分析するFDAのLC/MS/MSテストソッドに適用することができる



LC/MS/MSメソッド

高感度で選択性の高いメソッドスクリーニング、
確認、定量に最も適している

HILICメソッドは、FDAでメラミンとシアヌル酸の
テストメソッドとして報告されている

イオン交換モードは、China GBでLC/MS/MSに
よる乳製品中のメラミンとシアヌル酸の分析メソッド
として報告されている



LC/MS/MSメソッド-HILICモード

- ◆ シンプル、感度、選択性が良好であり、スクリーニングや、確認、定量に適している
- ◆ 誘導体化の必要はないが、固相抽出による前処理が必要である
- ◆ FDAにより報告されたメラミンとシアヌル酸のテストメソッドである



LC/MS/MS HPLCパラメータ - HILICモード

- HPLC system : Agilent 1200 RRLC
- Column : Agilent ZORBAX Rx-SIL, 2.1 × 150 mm, 5 mm
P/N 883700-901
- Injection Volume : 10 μL
- Temp : 40°C
- Flow rate: 0.2 mL/min
- Mobile phase : A - 5 mM Ammonium acetate@Water
: B - 5 mM Ammonium acetate@ACN
- Isocratic : 95%B



LC/MS/MS MSパラメータ – HILICモード



MS system	: Agilent LC/MS/MS QQQ
Ion source	: ESI
Polarity	: Positive and Negative
Nebulizer gas	: Nitrogen
Ion spray voltage	: 4000V
Source temperature	: 350°C
Resolution	: Q1 (unit) Q3 (unit)
Scan mode	: Multiple Reaction Monitoring (MRM)
Segment	: Segment 1= 0~4 min negative for cyanuric acid Segment 2= 4~6 min positive for melamine
Delta EMV	: 600V

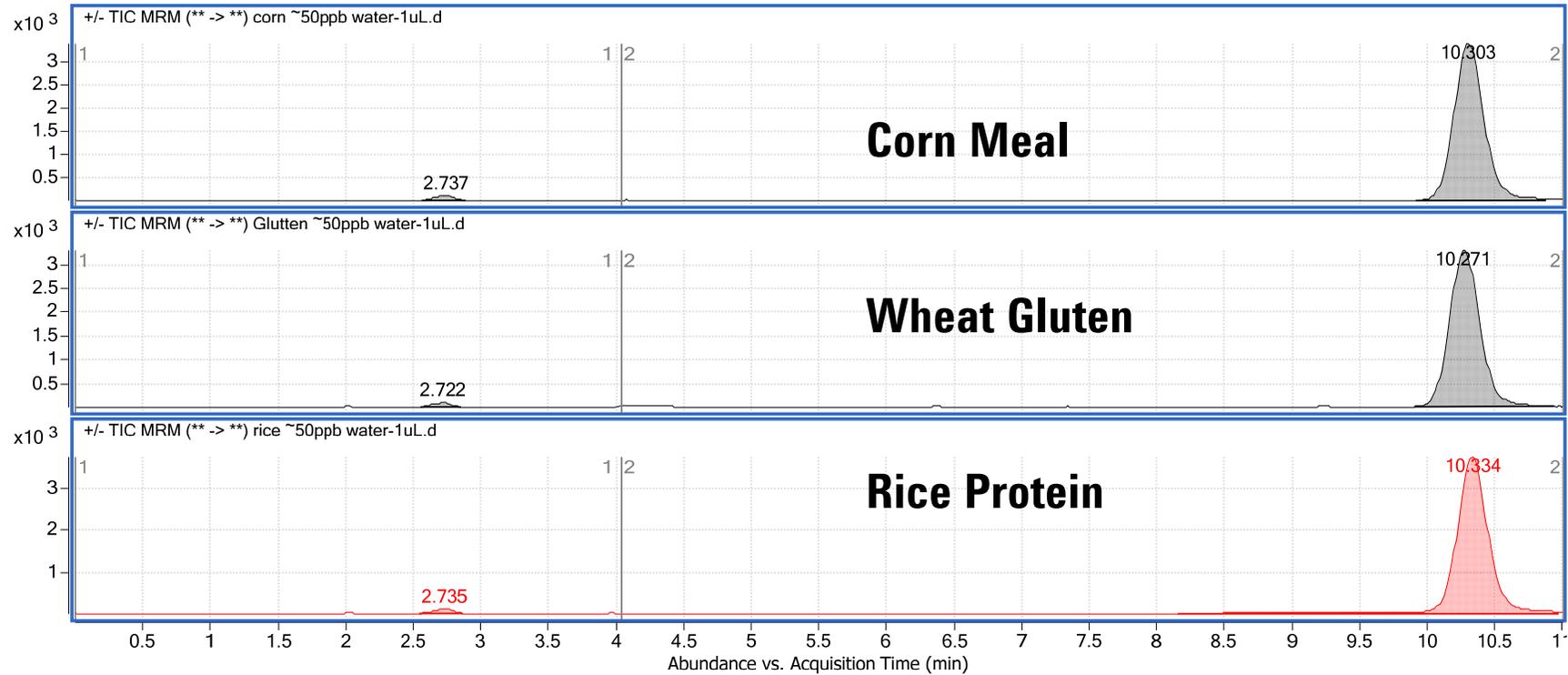


MRM 条件

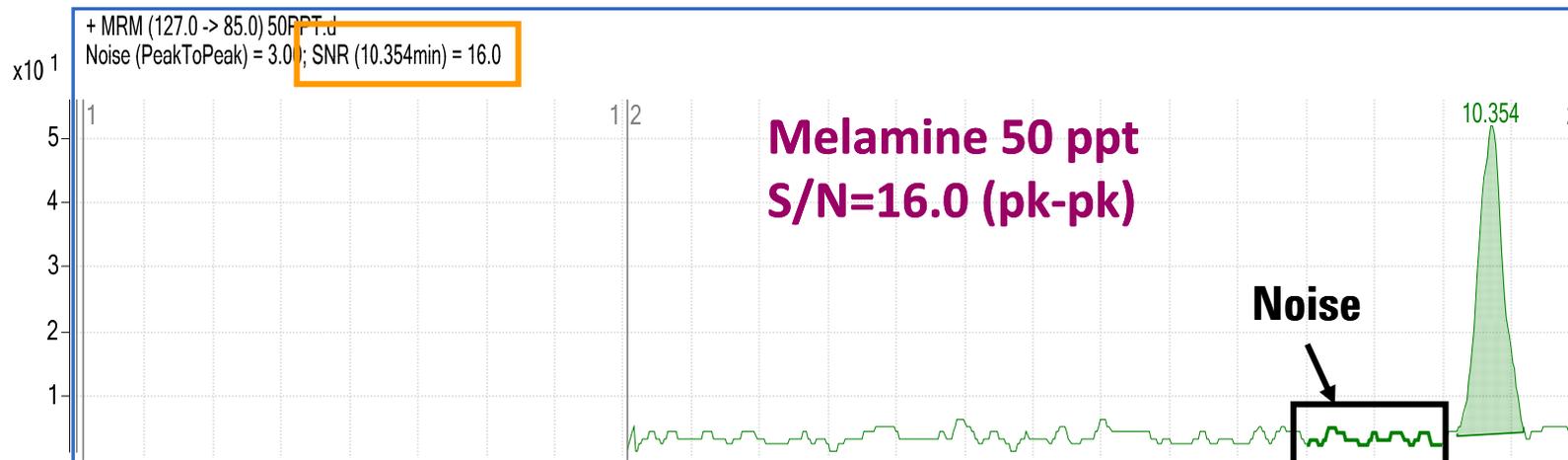
Time	Compound	Precursor	Product	Dwell	Fragmentor	Collision Energy
				(ms)	(V)	
9.9	Melamine	127	85	200	100	20
		127	68	200	100	35



LC/MS/MS HILIC モードの分析結果 — 50 ppb添加

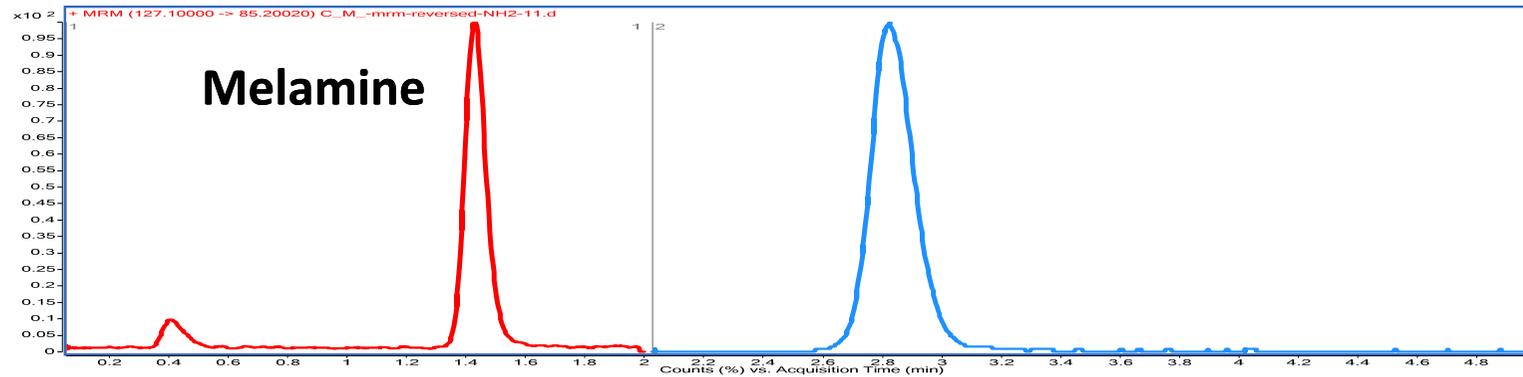


LC/MS/MS HILICモード — 高感度と高選択性

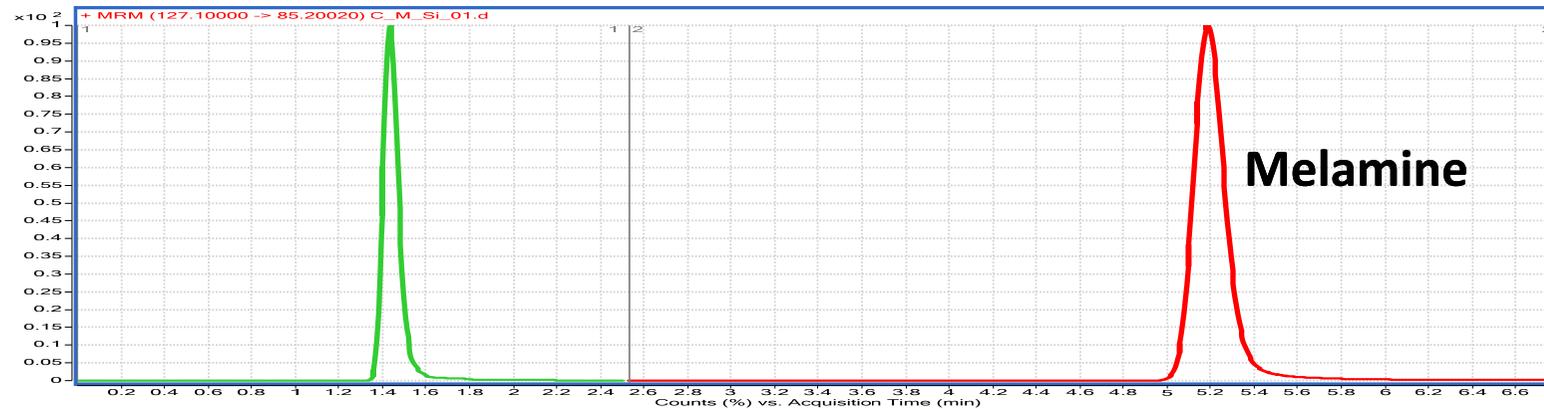


6410LC/MS/MSシステムの測定結果
6460シリーズでは更に高感度化が可能

その他のカラムを用いたHILICモードによる分析



ZORBAX NH₂カラムを用いたHILICモードによる分離



ZORBAX Rx-SILカラムを用いたHILICモードによる分離

LC/MS/MS – イオン交換モード

- ◆ シンプル、感度、選択性に優れたメソッド。乳製品中のメラミンのスクリーニング、確認、定量分析に適している
- ◆ 誘導体化の必要はないが、多くの場合固相抽出による前処理が必要
- ◆ China GBメソッドはAgilentのLC/MS/MSシステムにて開発された



LC/MS/MS イオン交換モード

LC 条件



◆ HPLC system	1200 LC system with binary pump
◆ Column	Agilent ZORBAX 300SCX, 2.1×150 mm, 5 μm P/N: 883700-704
◆ Injection Volume	10 μL
◆ Flow rate	0.2 mL/min
◆ Temperature	40°C
◆ Mobile phase	A---10 mM NH ₄ Ac/Acetic acid pH adjusted to 3.0; B---ACN A:B=20:80
◆ Run time	10 min



LC/MS/MS イオン交換モード

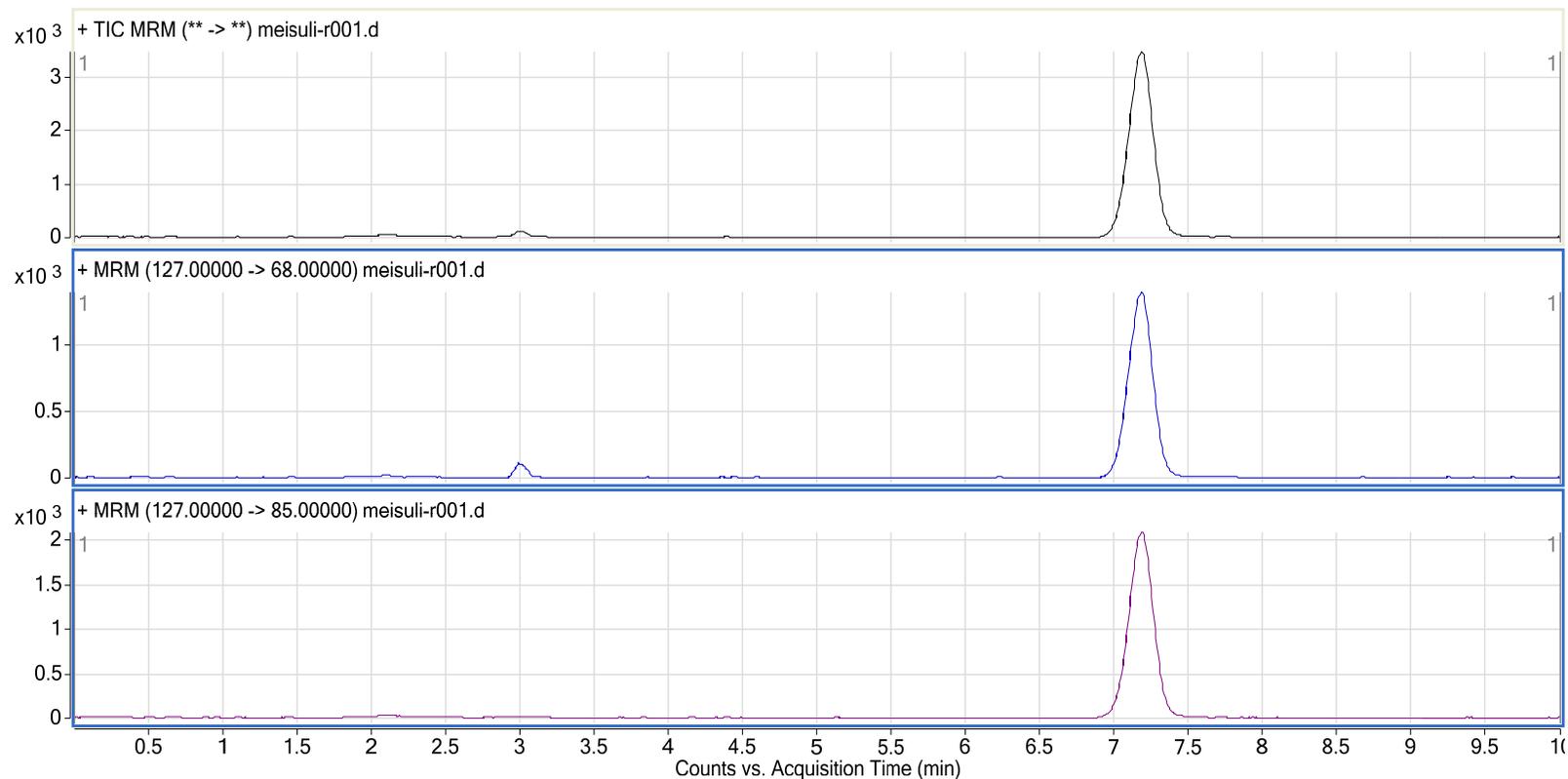
MS/MS条件

◆ MS system	Agilent 6410A LC/MS/MS
◆ Ion source	ESI
◆ Polarity	Positive
◆ Nebulizer gas	Nitrogen
◆ Ion spray voltage	4000V
◆ Dry gas temperature	350°C
◆ Dry gas flow rate	9 L/min
◆ Nebulizer pressure	40 psi
◆ Resolution	Q1 (unit) Q3 (unit)
◆ Scan mode	Multiple Reaction Monitoring (MRM)

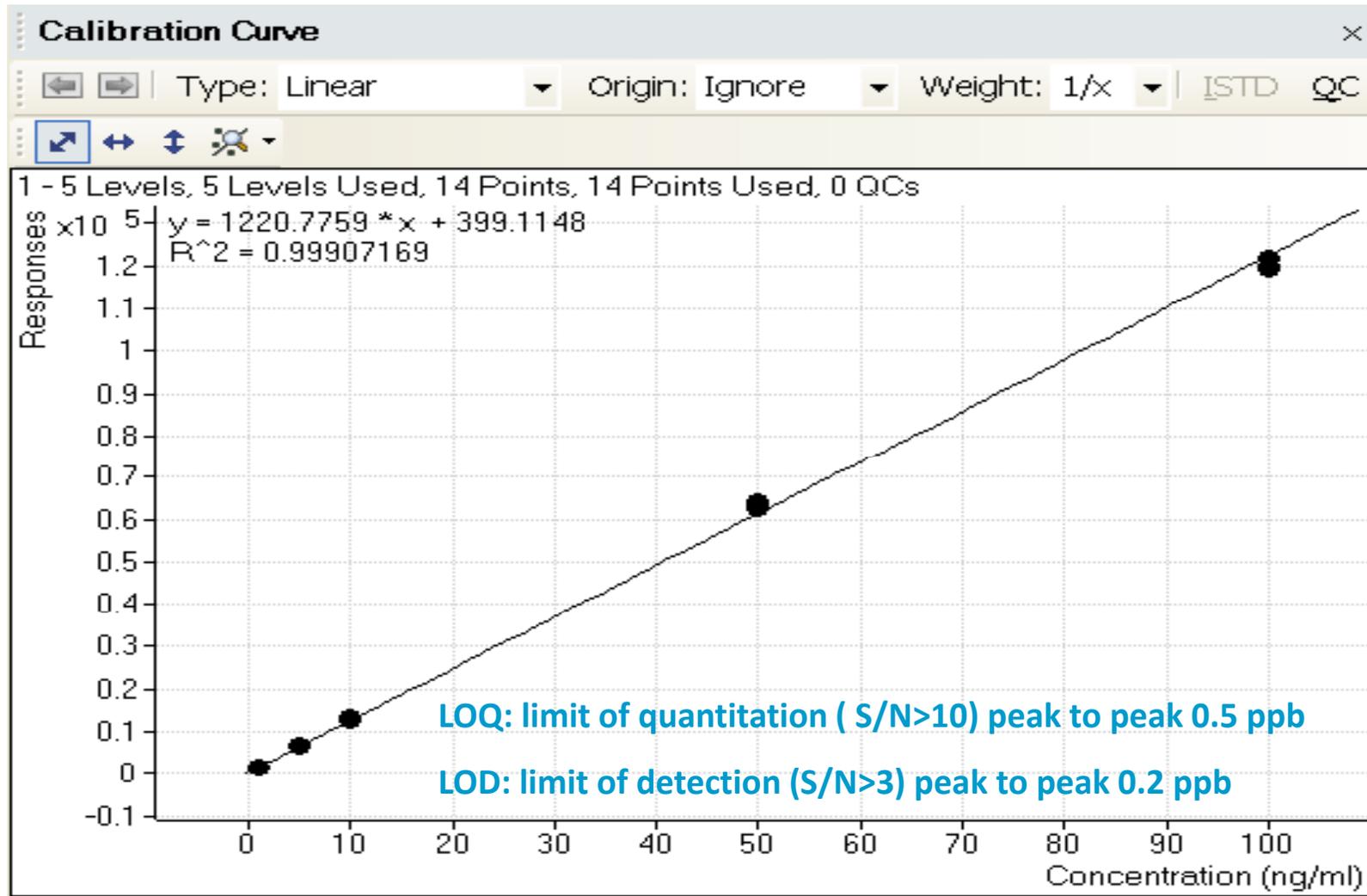


LC/MS/MS イオン交換モードの測定結果 – 粉ミルク

Melamine assay: 18.3 ppb



LC/MS/MS イオン交換モードの測定結果 - 検量線



LC/MS/MS QQQ メソッド まとめ

- シンプル、感度、選択性に優れたメソッド。スクリーニングや確認、定量分析に適した手法
- 誘導体化の必要はないが、多くの場合固相抽出による前処理が必要
- ZORBAX Rx-SIL順相用カラムを用いてHILICモードで分析することにより、エレクトロスプレー(ESI)LC/MSに適用させることができる
- ZORBAX 300SCXイオン交換カラムを用いることにより、マトリックスを含むサンプルの前処理のステップを最小限にすることができる。シンプルで迅速なメソッドである
- FDAでは、HILICモードを用いたテストメソッドが報告されている



Agilent製品がメラミン分析に用いられる理由

Agilent の専門的技術:

- ◆ メラミン分析の豊富な経験: US FDA メソッドがペットフードの分析のために Agilent GCMS および LCで、China GB メソッドがミルク製品の分析のために AgilentのGC, LC, LC/MS/MSで開発された
- ◆ 世界的に政府および食品分析ラボとコラボレーション: AQSISQ, MOH, EU Community reference labs, US FDA および USDA
- ◆ 数多くの発行済みアプリケーション: Food Compendium

継続的なラボオペレーションを実現する、信頼性の高い分析システム:

- ◆ 世界中の食品分析ラボへの、豊富な納入実績を通して実証された信頼性: 分析ラボ、政府系ラボ、産業ラボ

Agilent サポート:

- ◆ システムのトップパフォーマンスでの運転を維持し、途切れのないラボオペレーションをサポート。ニーズに合ったユーザートレーニングコースも提供しています
- ◆ メラミン分析において、LCおよびGCをベースとしたアプリケーションに対する豊富なカラム、SPEサンプル前処理をラインナップ: J&W DB5-ms キャピラリカラム、Zorbax Rx-Sil C8 LC カラムが US FDA やChina GB メソッドで活躍



Agilent が提供するソリューション – THE List

- **SPE サンプル前処理** (China GB 相当): 新製品の SampliQ SCX を用い、複雑なサンプルマトリクス干渉を効果的に除去

- **GC/MS** (FDA, China GB メソッド): J&W DB5-MS キャピラリカラム, TMS 誘導体化 によるマトリクス中のサンプルスクリーニングおよび確認分析

オプションとしてのバックフラッシュ: キャピラリ・フロー・テクノロジーをベースとしたバックフラッシュがサンプル前処理の必要性を最低限のものとし、GC サイクルタイムを1/5に短縮

- **HPLC** (FDA, China GB): 逆相系Zorbax Rx-Sil C8 カラムをイオンペアモードで使用した、ルーチンの定量分析

オプションとしてのイオン交換LCメソッド: Zorbax 300SCX イオン交換カラムが イオンペア剤の必要性をなくします。China GB LC/MS/MS メソッドに確認分析との組み合わせを簡単にしました

- **LC/MS/MS** (FDA research method 相当) : Zorbax Rx-Sil カラムが、エレクトロスプレー (ESI) LC/MSとの相性がよいhydrophilic interaction mode (HILIC)での分析を実現。非常にシンプル、高感度、高選択性のメラミン分析 を提供します

イオン交換カラムでのLC/MS/MS (China GB メソッド) : Zorbax 300SCX (GB 相当) イオン交換カラムがイオンペア剤の必要性をなくします。



メラミン分析に関する情報

- アプリケーションノート (PN: 5989-7546EN) GC/MS, LC and LC/QQQ on FDA methods
- FDAのGC/MS、LCメソッドに関する詳細情報

標準GC/MSメソッド: <http://www.fda.gov/cvm/GCMSMelamine.htm>

2008年10月更新情報: <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4423.html>

標準LC/MS/MSメソッド: <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4421.html>

<http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4422.html>

FDAテストメソッドの記事: <http://www.fda.gov/oc/opacom/hottopics/melamine.html#testing>

- App. briefs on GC/MS, LC, and LC/QQQ on China GB and Agilent's improved method

Backflush GC/MS method (in Chinese)

Ion-exchange LC method (in Chinese)

Ion-exchange LC/MS/MS method (in Chinese)



参考情報:

- Food folder: PN: 5989-7295EN
- Food Safety Brochure: PN: 5989-7237EN
- Agilent Brochure: Pesticide analysis in food: PN 5989-8652EN
- Food Safety Compendium
- LC Food solutions guide: PN: 5989-5674EN
- SampliQ sample preparation brochure: PN: 5989-9334EN

