

Application Note # LCMS-49

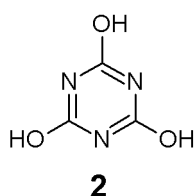
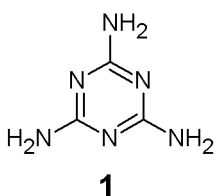
การตรวจวัดเมลามีนและกรดไซยานูริก

โดยใช้ลิควิดโครมาโตกราฟีแมสเปคโตรมิเตอร์ภายใน ๕ นาที

ในเดือนกันยายน ๒๕๕๑ ที่ผ่านมา ทารกและเด็กก่อน ชาวจีน มากกว่า ๒๙๔,๐๐๐ คนต้องเข้ารับรักษาตัวในโรงพยาบาล จากปัญหาทางเดินปัสสาวะและไต เนื่องจากการกินนมผง และผลิตภัณฑ์นมที่ปนเปื้อนสารเมลามีน (โครงสร้าง 1) และ กรดไซยานูริก (โครงสร้าง 2) และยังพบอีกว่าเด็ก ๆ กว่า ๒๒ ล้านคนมีเมลามีนและกรดไซยานูริกในร่างกาย นอกจากนี้ในปี ๒๕๕๐ ยังมีการปนเปื้อนของสารเดียวกัน ในอาหารสัตว์และ ผลิตภัณฑ์ โปรตีน อื่น ๆ การตรวจวัด ในรายงานนี้ แสดงว่า การวิเคราะห์หาสารกลุ่มนี้โดยใช้ลิควิดโครมาโตกราฟีแมสเปคโตรมิเตอร์นั้นสามารถทำได้มีประสิทธิภาพและสะดวก ต่อการใช้งาน

ความนำ

การปนเปื้อนเมลามีน (1) และกรดไซยานูริก (2) ในอาหาร มีผลเสียต่อสุขภาพอย่างมาก ปัจจุบันนับว่ามีความจำเป็น ที่จะต้อง ตรวจหาและวิเคราะห์ สารกลุ่มนี้ในสารตัวอย่างต่าง ๆ เพราะมีการปนเปื้อนในอาหารสูงอย่างน่าวิตก ตัวอย่างเช่น องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา กำหนดปริมาณสูงสุด ของสารเหล่านี้ อยู่ที่ไม่เกิน 1 ppm ในอาหารและนมเด็กและ 2.5 ppm ในอาหารอื่น



การตรวจวัดสารสองตัวนี้สามารถทำได้โดยใช้หลายเทคนิคโดย เฉพาะโครมาโตกราฟี (ทั้งลิควิดโครมาโตกราฟี และก๊าซโครมาโตกราฟี) แต่ลิควิดโครมาโตกราฟี

แมสเปคโตรมิเตอร์ จะสะดวกและมีประสิทธิภาพกว่า ก๊าซโครมาโตกราฟีแมสเปคโตรมิเตอร์ ทั้งนี้เพราะความ จำเป็นที่จะต้องเป็นแปลงสารนี้ให้เป็นอนุพันธ์ (derivatization) เพื่อให้ระเหยได้สำหรับ การวิเคราะห์ โดยก๊าซโครมาโตกราฟี (สารสองตัวนี้ ในรูปปกติ ระเหยยาก จึงต้องแปลงเป็นอนุพันธ์ ก่อนการวิเคราะห์ โดยใช้ก๊าซโครมาโตกราฟี)

การใช้เครื่องไอออนแทรปความจุสูง (High Capacity Trap--HCTultra) เหมาะกับงานการวิเคราะห์ นี้เพราะสามารถ ตรวจวัดแบบ FullScan, MSn และ MRM. การที่ HCTultra สามารถในการวิเคราะห์ แบบ FullScan ช่วยให้สามารถตรวจวัด unknown ได้ดี เมื่อเทียบกับ triple quadrupole. HCT มีขนาดกระทัดรัดและง่ายต่อการใช้งาน รวมถึงสามารถ ปรับเครื่องเพื่อทำงาน MRM โดยอัตโนมัติ. รายงานนี้นำเสนอ ไอออนแทรป ความจุสูง HCTultra ร่วมกับคอลัมน์ Acclaim mixed-mode WAX-1 จาก Dionex.

การตั้งค่าต่าง ๆ ของเครื่อง**และข้อมูลเฉพาะในการทดลอง**

ตัวละลายเกรดลิควิดโครมาโตกราฟี จาก Burdick and Jackson (Morristown, NJ, USA), สารมาตรฐานอ้างอิงเมลามีนและกรดไซยานูริก จาก Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) นำสำหรับ โครมาโตกราฟี ได้รับการกรอง โดยใช้ Milli-Q™, (Millipore corporation, Billerica, MA,

USA) เครื่องที่ใช้ HCTultra, Bruker Daltonics และ Ultimate 3000 จาก Dionex.

การสร้างกราฟแคลิเบรชัน (Calibration Curve)

เริ่มจาก 1 mg/mL ของสารละลายของสารมาตรฐานอ้างอิงและเจือจาง ต่อเนื่องเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.1-1000 ng/mL (ppb). สารละลาย Stock เตรียมจากการละลายสารใน MeOH:H2O 1:1 สำหรับการละลายเพื่อทำแคลิเบรชันนั้น ใช้ ACN:H2O 1:4

การเตรียมตัวอย่าง (Sample Extraction)

นมผงเด็กถูกสกัดใน ACN:H2O 1:4 โดยใช้ ultrasonic bath ๓๐ นาที และตามด้วยการปั่นแยกที่ 10,000 rpm เป็นเวลา ๑๐ นาที สารละลายถูกแยกและปั่นแยกซ้ำที่ 12,000rpm เป็นเวลา ๑๕ นาที จากนั้นสารละลายที่ได้ถูกนำไปละลายต่อไปอีกเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม สำหรับการตรวจวัดโดยใช้ ลิกวิดโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรมิเตอร์ (0.1-1000ppm) สารอ้างอิงที่ใช้เติมลงไป ในสารตัวอย่างนมผงเด็ก (spike) ก็ถูกสกัดโดยวิธีเดียวกัน

การปรับลิกวิดโครมาโตกราฟี (LC-MS conditions)

การทดลองครั้งนี้ใช้เครื่องลิกวิดโครมาโตกราฟี Ultimate 3000 Dionex column Mixed Mode WAX-1 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) 2.1x150mm, 5um โดยรักษาอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 C. โครมาโตกราฟีถูกแบ่งเป็นสองส่วนในกรณีการตรวจวัดเมลามีน และกรดไซยานูริกพร้อม ๆ กันในคราวเดียว mobile phase H2O + 0.1 % formic acid ACN gradient program ปรากฏในตาราง Table 1 flow = 0.3 ml/min Injection volume = 10 uL

Table 1 HPLC Gradient

Time	%A	%B
0.0	90	10
2.0	50	50
2.5	90	10
5.0	90	10

FullScan

HCTultra ultrascan

50-200 m/z,

เมลามีน ขั้วบวก positive mode

กรดไซยานูริก ขั้วลบ negative mode

ใช้ accumulation time คงที่ที่ 20 msec

ผลการทดลอง

FullScan

สามารถตรวจวัดได้ทั้งเมลามีนและกรดไซยานูริก ในคราวเดียวกันภายใน ๕ นาที

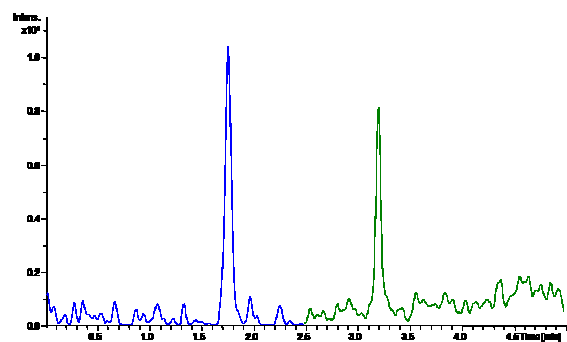


Figure 1 Less than 5 mins for the detection of melamine (positive mode, RT=1.75min) and cyanuric acid (negative mode, RT=3.25min)

Multiple reaction monitoring (MRM)

ภาพ Figure 3 แสดงขีดจำกัดการวัด (Limit of detection --LOD) อยู่ที่ 0.05 ppb (S/N = 50:1) การทดลอง spike มีการเติมเมลามีนและ

กรดไซยานูริก ทำที่ความเข้มข้น 1.0 ppm และ 2.5 ppm เพื่อทดสอบความสามารถ ในการตรวจวัด

ของเครื่องมือ เหตุที่ใช้สองค่านี้เพราะเป็นค่าที่ทางการกำหนดใช้ ในการควบคุมคุณภาพ

ผลการทดลองของนมผงที่มีการปนเปื้อน

สารตัวอย่าง ๒ ตัวอย่างได้รับมาจากประเทศจีน

ตัวอย่างแรก ให้ค่าการวัดที่ 17ppm และตัวอย่างที่สองที่ 9ppm ซึ่ง ทั้งสองมีปริมาณ

เมลามีนสูงกว่าที่ทางการกำหนด ไว้มาก

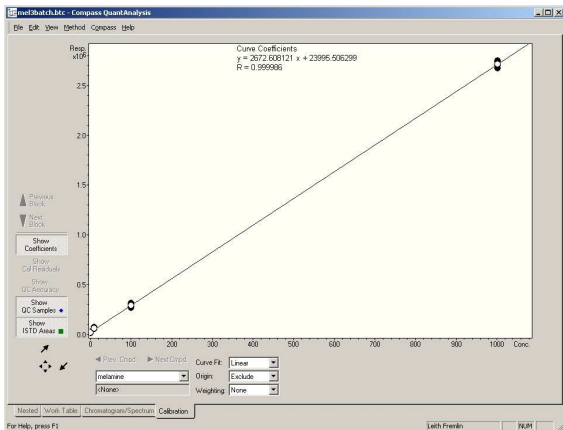


Figure 2 Calibration curve of MRM for melamine (1 – 1000 ppb)

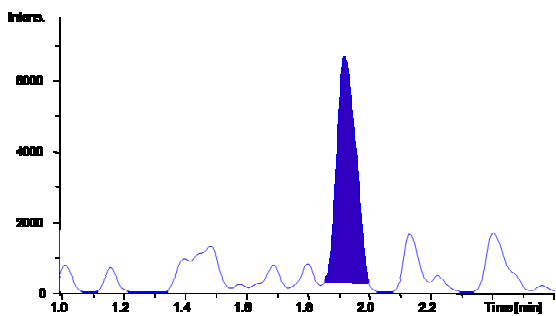


Figure 3 positive EIC trace of m/z 85.3 & 68.5 for 0.05ppb injection of melamine.

Melamine
Isolate: 127.1
Width: 0.6 m/z
Amplitude: 0.6 V

สรุปผลการทดลอง

การตรวจวัดเมลามีนที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ สามารถทำได้ โดยสะดวก การใช้ HCT สามารถตรวจวัดปริมาณของ สารเมลามีนที่ความเข้มข้นตามที่ทางการกำหนดภายใน ๕ นาที



Figure 4 Instruments used for study

MRM parameters

การ isolate มีความสำคัญมากในการเพิ่มความเฉพาะเจาะจงและความแม่นยำในการวัด ซึ่งได้รับการปรับให้เหมาะสมดังที่เห็นด้านล่าง

Leith J. Fremlin and Matthias Pelzing
Bruker Daltonics Division, Australia.
(Leith.fremlin@bruker-daltonics.com.au and matthias.pelzing@bruker-daltonics.com.au)

Keywords:
LC-MS Detection
Melamine
MRM

Instrument & software
HCTultra
Compass Quant Analysis

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.
สำหรับงานวิจัยเท่านั้น ไม่ควรใช้ในงานวินิจฉัยโรค