

食の安全における LC-MS/MS 分析の問題点

望月直樹

Problems on LC-MS/MS Analysis to Ensure Food Safety

Naoki MOCHIZUKI

*Research Laboratories for Food Safety Chemistry, ASAHI BREWERIES, LTD.,
1-21 Midori 1-chome, Moriya, Ibaraki 302-0106, Japan*

(Received September 21, 2010)

An accurate analysis is required to address various issues concerning the food safety. Many risk factors, such as agricultural chemical residues, residual veterinary drugs, mycotoxins, food additives, and carcinogens produced during food processing may be present in foodstuffs. High-performance liquid chromatograph-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is an analytical system advanced in terms of sensitivity, selectivity, and flexibility. The system has been widely applied to food analysis. Food contains a wide variety of nutritional components, which may cause interference with food analyses. Then, sample preparation to remove such interference and an appropriate choice of an analytical technique is required. Even with LC-MS/MS, the analytical reliability may be reduced by matrix effects, due to interference from food components. In this review, we summarize issues on using LC-MS/MS to achieve good analyses for the food safety and discuss how to address it. The topic especially focuses on matrix effects.

Key words—food analysis; LC-MS/MS; matrix effect; HPLC separation; ion suppression; food safety

近年、食品の安全に係わる諸問題が多数発生しており、食品の安全性を確保するために正確な分析に基づく管理体制が今まで以上に求められている。しかし食品の安全性に関する問題はデリケートな部分も多く、科学的根拠に基づいた最先端かつ確実な分析法の開発が求められており、高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた食品中の微量成分分析の需要がここ数年急速に広がってきた。本稿では食の安全における LC-MS/MS 分析の問題点、特にマトリックス効果を中心に紹介する。

食品の安全における分析

食品は、炭水化物、脂質、タンパク質、ミネラル、ビタミンなどの栄養成分や繊維質及び色素など多種多様な成分で構成されている。これらが複雑なマトリックスとなり分析を妨害するため、食品中の微量成分分析は困難を極める。また、食品の安全性

に係わる分析対象成分には、残留農薬、残留動物用医薬品、カビ毒、食品添加物、食品加工中に生成される発がん物質等の多くの危険因子が挙げられ、これらの物性は多岐にわたっている。その上、新たな危険因子の発見や基準の厳格化に伴い、今後も分析対象成分は増加すると考えられる。

このような背景の下、食の安全に関する分析において、LC-MS/MS が注目を集めるようになった。LC-MS/MS は、ガスクロマトグラフ・質量分析装置 (GC-MS) が不得意とする不揮発性成分や熱不安定性成分も測定可能なため、適用範囲が広く汎用性が高い。また、タンデム型質量分析装置 (MS/MS) はイオンの選択を2度行うため化合物選択性が高く、マトリックス存在中でも目的成分を高感度で選択的に測定することができる。残留農薬のポジティブリスト制度の導入による対象成分数の大幅な増加と基準値の厳格化をうけて LC-MS/MS の食品分析への導入が急速に進んだ。LC-MS/MS は感度、選択性及び汎用性の点で、いまや食品分析には欠かせない分析機器となっている。

LC-MS/MS の原理

LC-MS/MS は高速液体クロマトグラフ (HPLC)

アサヒビール株式会社コーポレート研究開発本部食の安全研究所 (〒302-0106 茨城県守谷市緑 1-1-21)

e-mail: naoki.mochizuki@asahibeer.co.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S32 で発表したものを中心に記述したものである。

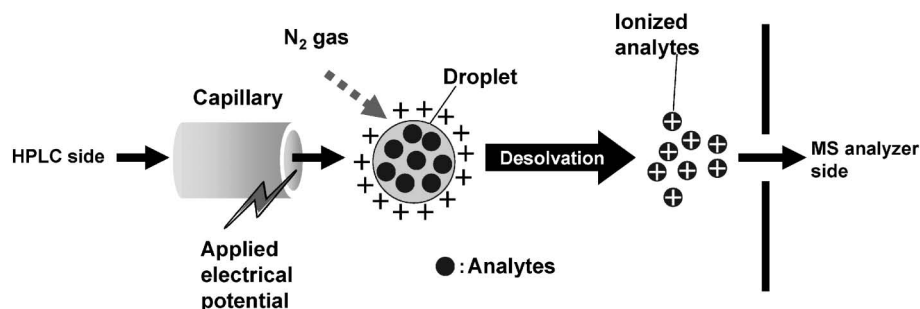


Fig. 1. Conceptual Scheme of Electrospray Ionization

とタンデム型質量分析装置 (MS/MS) とを結合した装置であり、分析サンプルを HPLC で分離した後、目的成分の MS/MS 分析を行う。質量分析装置は成分をイオン化するイオン源、イオンを分離する質量分析部、分離されたイオンを検出するイオン検出器からなっている。

LC-MS/MS で主に用いられているイオン化法は、大気圧中で気相イオン化を行う大気圧イオン化 (API) 法である。大気圧イオン化法の一つであるエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法では、HPLC からの溶出液を高電圧 (2000–4000 V) で印加したステンレスキャピラリーを通して帯電させる。次に、キャピラリーから大気圧下に噴霧され帯電した液滴は、蒸発と分裂を繰り返して微小化し、最終的に目的成分のイオンが気相中に放出される (イオン蒸発) と言われている。ESI 法は、ソフトなイオン化法で、幅広い化合物に適用可能であることから、食品分析の分野で多用されている (Fig. 1).¹⁾

質量分析部は、イオン化されたイオンを質量/電荷 (m/z) 別に識別する部分であり、MS/MS では第一の MS (MS1)、コリジョンセル、第二の MS (MS2) の 3 つの主要ユニットで構成されている。まず、イオンは MS1 で分離され、目的質量を有するイオン (プリカーサーイオン) が選択的にコリジョンセルに導入される。プリカーサーイオンは、コリジョンガスの衝突を受け開裂し、プロダクトイオンになる。開裂パターンは化合物によって異なり、たとえ異なる成分由来の同一分子量を持つイオンがコリジョンセルに導入されても、生じるプロダクトイオンは異なる m/z を有する可能性が高い。生じたプロダクトイオンを MS2 で選択的に分離し、目的物質に特異的なイオンが検出器へと導入される。すなわち二段階の質量イオン選択を経ることで、極

微量成分の選択的な分析を可能としている (Fig. 2)。

マトリックス効果

LC-MS/MS を用いた食品分析の主な問題点として、マトリックス効果によるイオン化抑制及び促進が挙げられる。マトリックス効果は、分析の信頼性を低下させることから、LC-MS/MS で定量分析をする際には注意が必要である。

LC-MS/MS におけるマトリックス効果とは、食品中に含まれる夾雑成分 (マトリックス成分) の影響で目的成分のイオン化効率が変化し、実サンプル中の目的成分の感度が標準溶液と比較して、低下したり、上昇したりする現象のことである。LC-MS/MS 分析においては感度低下が起こることが多く、この現象をイオン化抑制 (イオンサプレッション) と言う。これはイオン源におけるイオン化がマトリックス成分と競合することにより、目的成分自身のイオン化が抑制されるために起こると言われている (Fig. 3).²⁾ 逆に、感度上昇が起きるイオン化促進 (イオンエンハンスメント) も存在する。

分析値がマトリックス効果を受けているかは、次の方法で確認することができる。一定濃度の標準液 (A) と、無汚染試料を前処理したマトリックスサンプルに標準物質を同濃度添加した溶液 (B) を分析し、得られた MS クロマトグラムの面積値を比較する。面積値が「A>B」であればイオン化抑制



望月直樹

アサヒビール㈱理事。食の安全研究所長。薬学博士。1982年東京薬科大学大学院博士課程前期修了。化粧品メーカー、樹脂メーカーを経て、1988年アサヒビール㈱中央研究所に入社。分析研究所安全評価部長を経て、2007年食の安全研究所長に就任。日本分析化学会理事、東京大学大学院、京都大学大学院非常勤講師を歴任。日本食品衛生学会理事。

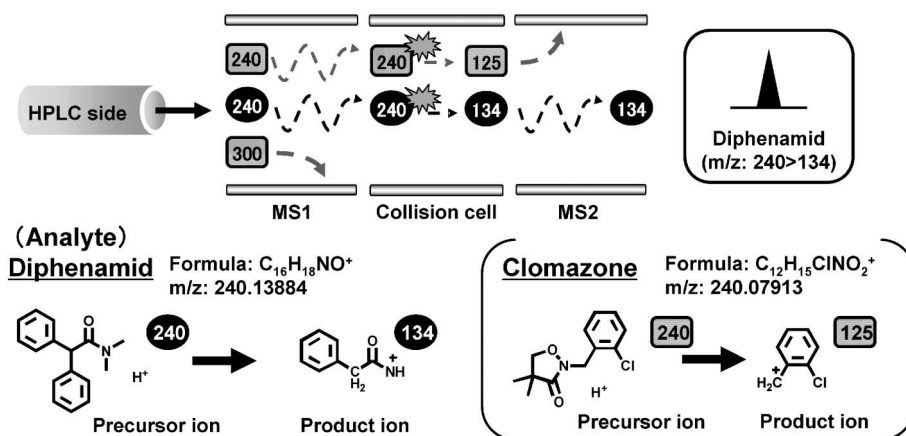


Fig. 2. Diagram Illustrating Selected Reaction Monitoring (SRM) of Diphenamid with a Different Compound Having the Same Precursor Ion (Clomazone) in LC-MS/MS Analysis

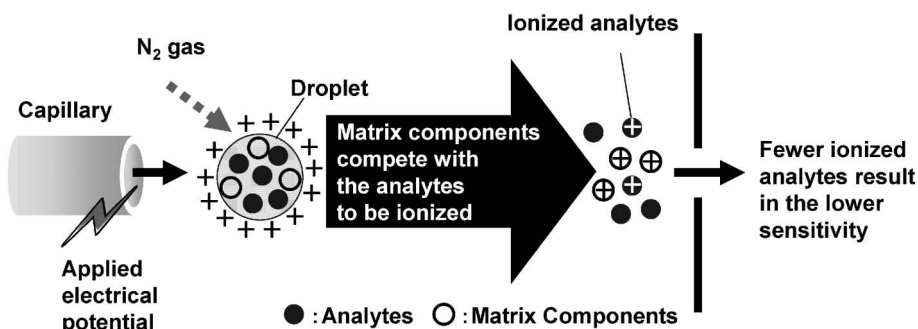


Fig. 3. Conceptual Scheme of Electrospray Ionization with Ion Suppression

(イオンサプレッション) が起きていることになり、絶対検量線 (標準液を用いた検量線) での定量が困難になる。一方、面積値が「 $A < B$ 」であればイオン化促進 (イオンエンハンスメント) が起きていることになる (Fig. 4)。

この問題を解決するためには、①適切なサンプル前処理、②HPLCにおける十分な分離、③定量分析法の選択が挙げられる。これら、LC-MS/MS分析におけるマトリックス効果の回避法について以下に述べる。

①適切なサンプル前処理

低濃度域で精度よく分析するためには、適切な前処理を実施し、マトリックスの影響を極力少なくした試料を調製する必要がある。食品中の微量成分分析の前処理としては、固相カラムによる精製が広く用いられており、逆相カラム、^{3,4)} イオン交換カラム、^{5,6)} 抗体カラム、⁷⁻⁹⁾ ケイソウ土カラム、¹⁰⁾ 多機能カラム^{5,11,12)} といった様々なカラムが利用されている。

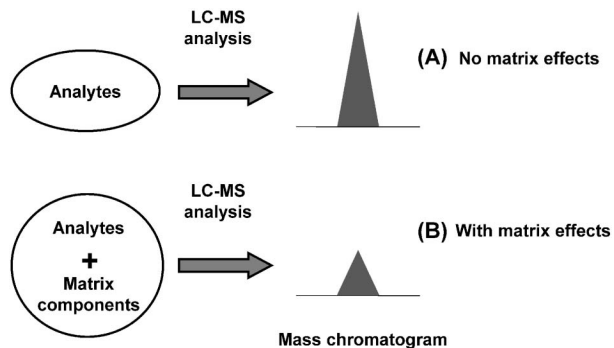


Fig. 4. Examples of Chromatograms (A) without Matrix Effects and (B) with Matrix Effects

逆相カラムやイオン交換カラムの場合、分析対象に応じて固相の種類及び処理溶媒の条件を選択し、マトリックス成分の除去と目的成分の選択的な抽出を行う。イオン交換カラムは、イオン性成分の選択的な抽出及び除去に有効である (Fig. 5)。⁶⁾ また、ポリビニルピロリドン (PVPP) を用いた逆相系樹脂カラムは、適度な化合物保持能力を有し幅広

い成分に適用可能である (Fig. 6).^{3,4)}

抗体カラム (イムノアフィニティーカラム) は、目的とする測定物質に特異的な抗体をあらかじめ固

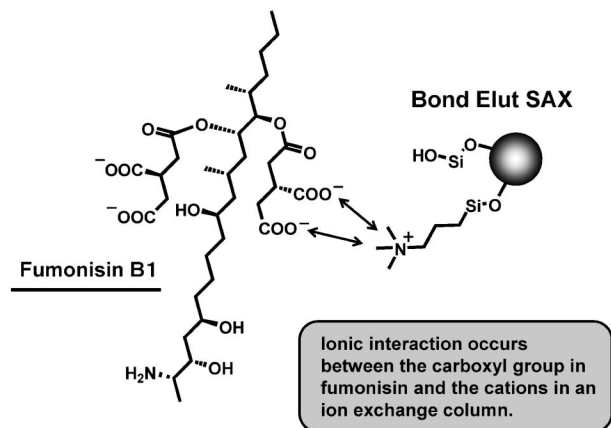


Fig. 5. Speculated Interaction Mechanism between Fumonisin B1 and an Ion Exchange Column

相担体に結合させたもので、目的物質以外の成分はこのカラムに保持されない。試料を抗体カラムに負荷した後、水溶液でマトリックスを洗い流し、最後に有機溶媒で抗体を変性させることにより目的物質をカラムから溶出させる。特にカビ毒分析においては、様々な抗体カラムが市販されており、選択性が高くマトリックス除去が簡便なため、広く用いられている。^{8,13,14)}

残留農薬に関する分析では、数百種類の農薬成分に対応しなければならないことから、LC-MS/MSによる一斉分析法が必須である。¹⁵⁻¹⁷⁾ 2003年に簡便で迅速なサンプル前処理法として、多成分一斉分析に適した QuEChERS 法「迅速 (Quick), 簡単 (Easy), 安価 (Cheap), 効率的 (Effective), 堅牢 (Rugged), 安全 (Safe)」が開発された。¹⁸⁻²⁰⁾ 農薬分析用の食品サンプル前処理を簡略化するためのメソッドで、固相カラムに用いられている固相担体を

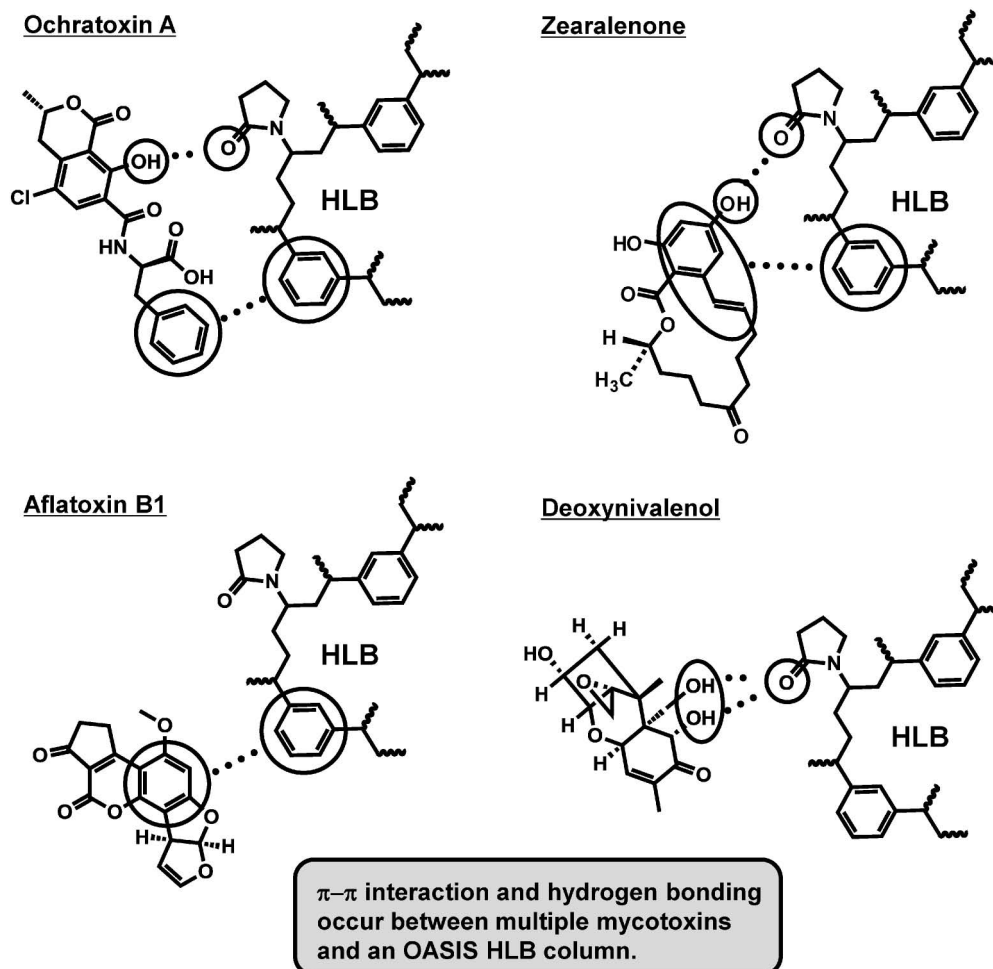


Fig. 6. Speculated Interaction Mechanism between Multiple Mycotoxins and a Hydrophilic-lipophilic-balanced (HLB) Column

抽出液に直接混合し、クリーンアップを行う。この方法は、一段階目でアセトニトリル抽出+塩析+脱水を行い、二段階目で固相担体を抽出液に直接混ぜてマトリックスを除去するという非常に簡便な前処理法で、多検体を短時間で処理することが可能である (Fig. 7)。広範囲の農薬分析が可能で、残留農薬一斉分析法の有用な前処理法として注目されており、既に各メーカーから、抽出用、精製の試薬がキット化され市販されている。

②HPLC 分離による十分な分離

質量分析装置のイオン源に到達する前に、HPLCで目的成分とマトリックス成分を十分に分離することが望ましい。LC-MS/MS 分析における Selected Reaction Monitoring Chromatogram (SRMC) では、他の夾雑物が全く見えなくても、Total Ion Current Chromatogram (TICC) では多くの夾雑物が同じリテンションタイムに重なっていることがある。他の検出法を併用しつつ分離条件を最適化し、十分な HPLC 分離を行うことは、マトリックスの影響を回避するのに有効な手段である。

近年、親水性化合物の分離及び分析で注目を集めている親水性相互作用クロマトグラフィー HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) は、順相クロマトグラフィーの一種で、逆相クロマトグラフィーでうまく分離できない親水性の高い極性化合物を LC-MS/MS を用いて分析する際に有効な手段である。例えば 2008 年中国で、牛乳中の窒素含有量を高くする目的で意図的にメラミンを混入させていた事実が発覚し、大問題になった。この事件の際

に、HILIC がメラミン分析に用いられ、大きな脚光を浴びた。²¹⁾ 分析カラムの固定相として高極性固相担体を用い、移動相として低比率の水を含む有機溶媒を用いる HILIC では、移動相にアセトニトリル等の揮発性有機溶媒を多く使用するため移動相の有機溶媒比率が高く、MS のイオン化部で溶媒が揮発し易く、イオン化効率が上昇する。そのため、移動相の水含有率が高い逆相条件による極性化合物の分析と比較して、高い感度が得られるという利点があり、LC-MS/MS に適した高極性化合物分析法と言える (Fig. 8)。²²⁾

③定量法の選択

マトリックス効果が無視できない際には、定量結果が分析試料中のマトリックスの影響を受け難い定量分析法を選択する必要がある。標準添加法、内部

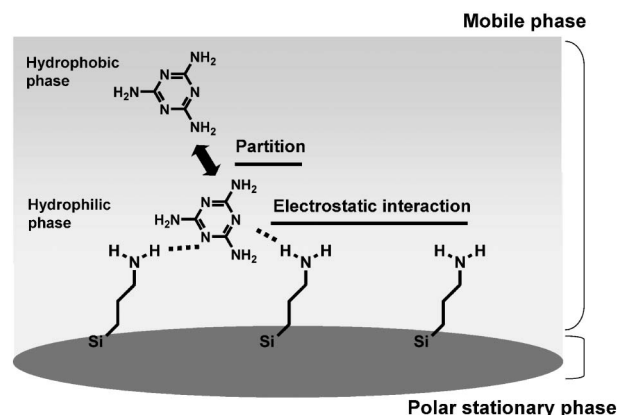


Fig. 8. Speculated Retention Mechanism of Melamine in a HILIC Column

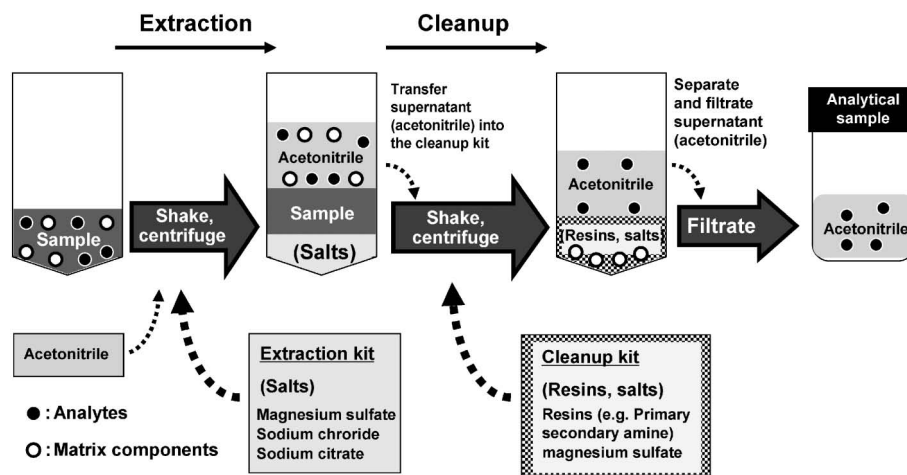


Fig. 7. Procedure for Sample Preparation in the QuEChERS Method

標準法，マトリックスマッチング法が主に用いられている。

標準添加法はマトリックスの影響を回避する方法として非常に有効であり，食品における LC-MS/MS を用いた定量分析で汎用されている。本法は，マトリックスを含む実サンプルに標準品を段階的に添加し前処理した検量線サンプルによる標準添加検量線で定量を行うため，マトリックスの存在が定量結果に影響し難い。しかし，分析する試料毎に検量線の作成が必要なこと，検量線サンプルにも実サンプルと同様の前処理が必要なことから，操作が煩雑で分析効率が悪いという欠点がある。

LC-MS/MS では内部標準法として，分析対象化合物と物理的・化学的性質がほぼ同じ安定同位体標識化合物を内部標準物質（サロゲート物質）に用いて定量する方法が用いられている。安定同位体標識化合物は，目的成分の一部を安定同位元素（重水素及び炭素 13 等）に置換したもので，分析対象化合物と分子量は異なるがほぼ同じ物理化学的性質を有している。また，溶出時間もほぼ同一なため，マトリックス効果の度合いが目的成分と同じであり，MS 分析における内部標準物質として適している。

現在，市販されている安定同位体標識化合物の標準品があり，これらを利用することによって，定量分析の精度を向上させることが可能である (Fig. 9).^{3,23)}

マトリックスマッチング法は，無汚染サンプルを前処理したものに標準品を段階的に添加した検量線サンプルによるマトリックス検量線を用いて定量を行う方法である。本法は，前処理工程における分析対象成分のロスに留意する必要がある。

その他 LC-MS/MS 分析の問題点

今回はマトリックス効果に焦点を当てて紹介したが，LC-MS/MS 分析には以下のような問題点も存在する。

まず，LC-MS/MS では不揮発性成分を含む移動相は使用できない。そのため，紫外吸光度分析 (UV 分析) では非常に一般的で，分離能に優れた移動相であるリン酸緩衝液の代わりに，揮発性の高い酢酸アンモニウム溶液やギ酸アンモニウム溶液を用いる。

さらに，LC-MS/MS の高感度化に伴い，UV 分析では問題とならなかった目的成分のキャリアオーバーが問題となっている。原因には，バイアル，イ

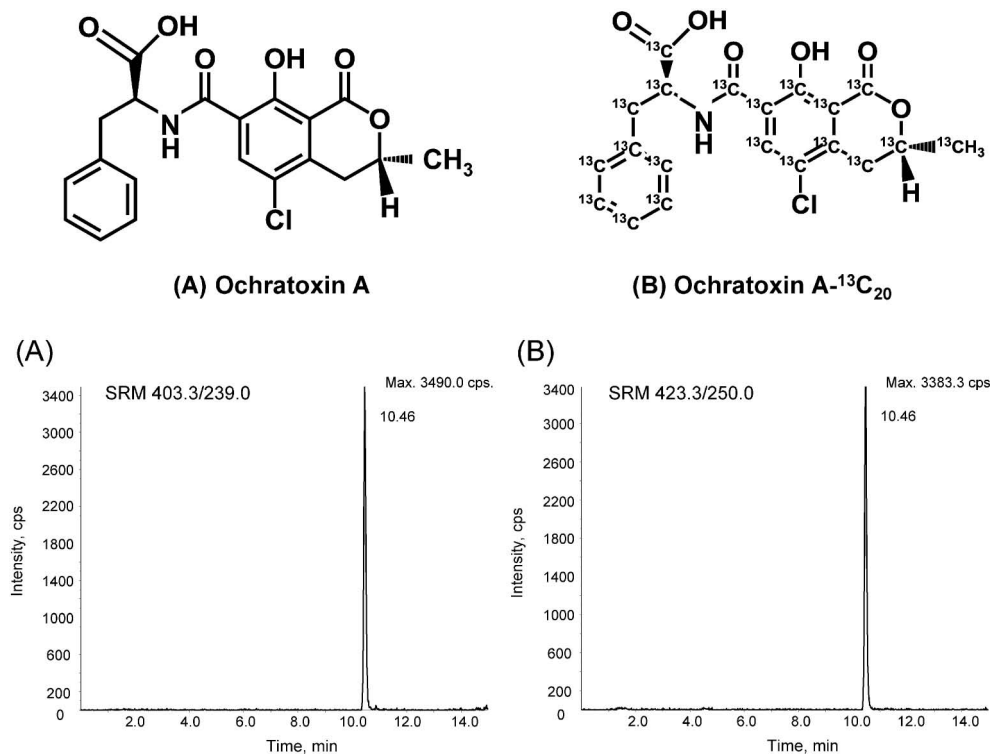


Fig. 9. Chemical Structures and Chromatograms of Ochratoxin A and Its Stable Isotope Labeled Compound

ンジェクション部, カラム結合部への吸着が考えられ, 各装置メーカーでその低減に努めているが, 実際に分析を行う際には洗浄条件の最適化などの工夫が必要である.

おわりに

LC-MS/MS を用いて定量分析を正しく行うためには, マトリックス効果に留意しながら分析法の開発を行う必要がある. 分析対象に適した前処理と HPLC 分離により, 目的成分を極力選択的に MS/MS へ導入することが, 正確な定量分析には重要である. また, マトリックス成分の十分な除去が困難な場合は, 標準添加法や, 安定同位体標識化合物を用いた内部標準法, 又はマトリックスマッチング法を用いることで影響を回避することが必要である.

LC-MS/MS の分野では, 新しい分析技術が絶えず開発されており, 今後も食の安全技術の中核を担う分析法として発展を続けるであろう. それら新規技術を取り入れつつ, 日常の分析法を見直すことで, より迅速に高感度かつ正確な分析結果を LC-MS/MS から得ることが可能となる. 分析化学者にとって, 分析対象成分及び分析手法に関する幅広い専門知識と洞察力が, 一層重要になってくると思われる.

REFERENCES

- Núñez O., Moyano E., Galceran M. T., *Trends Anal. Chem.*, **24**, 683–703 (2005).
- Villagrasa M., Guillamón M., Eljarrat E., Barceló D., *J. Chromatogr. A*, **1157**, 108–114 (2007).
- Ito R., Yamazaki H., Inoue K., Yoshimura Y., Kawaguchi M., Nakazawa H., *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 7464–7468 (2004).
- Mochizuki N., Hoshino M., Suga K., Sugita-Konishi Y., *J. Food Prot.*, **72**, 805–809 (2009).
- Suga K., Tamura M., Kitagawa Y., Mochizuki N., *Jpn. J. Food Chem.*, **14**, 93–98 (2007).
- Suga K., Mochizuki N., Yamashita H., *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **45**, 255–258 (2004).
- Nakajima M., *Bunseki*, **9**, 507–514 (2002).
- Noba S., Omote M., Kitagawa Y., Mochizuki N., *J. Food Prot.*, **71**, 1038–1042 (2008).
- Senyuva H. Z., Gilbert J., *J. Chromatogr. B*, **878**, 115–132 (2010).
- Suga K., Mochizuki N., Harayama K., Yamashita H., *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **45**, 307–312 (2004).
- Goda Y., Akiyama H., Otsuki T., Fujii A., Toyoda M., *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **42**, 56–62 (2002).
- Suga K., Mochizuki N., Harayama K., Yamashita H., *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **63**, 1–4 (2005).
- Senyuva H. Z., Ozcan S., Cimen D., Gilbert J., *J. AOAC Int.*, **91**, 598–606 (2008).
- Omote M., Kitagawa Y., Mochizuki N., *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **66**, 59–62 (2008).
- Omote M., Harayama K., Sasaki T., Mochizuki N., Yamashita H., *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **64**, 139–150 (2006).
- Ministry of Health, Labour and Welfare: <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-zen/zanryu3/siken.html>, cited 30 August, 2010.
- Soler C., Mañes J., Picó Y., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **38**, 93–117 (2008).
- Anastassiades M., Lehotay S. J., Štajnbaher D., Schenck F. J., *J. AOAC Int.*, **86**, 412–431 (2003).
- Hercegová A., Dömötöróvá M., Matisová E., *J. Chromatogr. A*, **1153**, 54–73 (2007).
- Takatori S., Okihashi M., Okamoto Y., Kitagawa Y., Kakimoto S., Murata H., Sumimoto T., Tanaka Y., *J. AOAC Int.*, **91**, 871–883 (2008).
- Heller D. N., Nochetto C. B., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 3624–3632 (2008).
- Nguyen H. P., Schug K. A., *J. Sep. Sci.*, **31**, 1465–1480 (2008).
- Noba S., Uyama A., Mochizuki N., *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 6036–6040 (2009).