

LC-MS/MS を用いた食品成分分析について

化学技術部 バイオ技術グループ 瀬戸山 央
橋本 知子

高速液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-MS/MS) は液体に溶けた成分に対して多成分を迅速、効率よく測定できる有用な装置である。本稿では神奈川県立産業技術総合研究所に導入されている超高速液体クロマトグラフータンデム四重極型質量分析装置を用いた食品栄養成分の分析について報告する。

キーワード: LC-MS/MS, 食品, アミノ酸, ビタミン

1 はじめに

超高速液体クロマトグラフータンデム四重極型質量分析装置 (UPLC-MS/MS) は液体クロマトグラフ装置と質量分析装置から構成されており、近年、食品添加物や食品残留農薬などの分析についても広く用いられるようになって¹⁾。MS/MS は、四重極型(Q1)、コリジョンセル(Q2)、四重極型(Q3)から構成されており Q1 でプリカーサーイオンを、Q3 では Q2 でプリカーサーイオンより生成したプロダクト (フラグメント) イオンを選択的に通過させることで、夾雑物の多い試料から目的成分のみを選択的に測定することが可能となる²⁾。

食品中には、アミノ酸、ビタミン、糖類、脂質、その他機能性成分など数多くの成分が含まれており、LC のみでは目的成分の分離、測定ができない場合が多い。一方で MS/MS を用いることで食品に含まれる多成分の中から目的成分を選択的に測定することが可能になる²⁾。本稿では、当所における UPLC-MS/MS を用いた食品栄養成分の分析について報告する。

2 実験方法

2.1 装置

UPLC-MS/MS は Waters 社製の ACQUITY UPLC H-Class および Xevo TQD を用いた。

2.2 遊離アミノ酸分析

アミノ酸標準液として和光純薬製のタイプ H を使用し 0.1N HCl で適宜希釈した後、AccQ・Tag Ultra derivatization kit (Waters 社製) を用いて誘導体化を行った。カラムは AccQ-Tag ultra C18 (内径 2.1 mm,長さ 100 mm,Waters 社製) を用い、表 1 および表 2 に示す分析条件で測定を行った。

2.3 水溶性ビタミン分析

水溶性ビタミンとして 11 種類のビタミン類を使用し、ギ酸アンモニウム 0.1%ギ酸水溶液で適宜希釈した。カラムは ACQUITY UPLC HSS T3 (内径 2.1 mm,長さ 100 mm,Waters 社製) を用い、表 3 および表 4 に示す分析条件で測定を行った。

表 1 遊離アミノ酸の LC-MS 分析条件

LC条件	
カラム温度	50°C
注入量	1.0µL
流速	0.70mL/min
移動相	A : AccQ・Tag Ultra Eluent A (10倍希釈液) B : アセトニトリル 0min (99.9:0.1) → 0.54min (99.9:0.1) → 5.74min (90.9:9.1) → 7.74min (78.8:21.2) → 8.04min (40.4:59.6) → 8.05min (10.0:90.0) → 8.64min (10.0:90.0) → 8.73min (99.9:0.1) → 9.50min (99.9:0.1)
MS条件	
イオン化法	ESI-Positive
キャピラリー電圧	1.0kV

表 2 遊離アミノ酸の MS/MS 分析条件

No.	化合物名	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (eV)
1	Histidine	326.0	156.0	20	15
2	Serine	276.0	171.0	30	25
3	Arginine	345.0	175.0	30	20
4	Glycine	246.0	171.0	30	20
5	Aspartic acid	304.0	171.0	30	25
6	Glutamic acid	318.0	171.0	30	25
7	Threonine	290.0	171.0	30	25
8	Alanine	260.0	171.0	30	20
9	Proline	286.0	171.0	30	25
10	Cysteine	581.0	171.0	40	40
11	Lysine	487.0	171.0	35	30
12	Tyrosine	352.0	171.0	35	30
13	Methionine	320.0	171.0	30	25
14	Valine	288.0	171.0	30	20
15	Isoleucine	302.0	171.0	30	20
16	Leucine	302.0	171.0	30	20
17	Phenylalanine	336.0	171.0	30	25

表3 水溶性ビタミンのLC-MS分析条件

LC条件	
カラム温度	40℃
注入量	5.0μL
流速	0.45mL/min
移動相	A : 10mM ギ酸アンモニウム0.1%ギ酸水溶液 B : 10mM ギ酸アンモニウム0.1%ギ酸含メタノール
グラジエント条件	0min (99 : 1) → 3.00min (99 : 1) → 3.01min (95 : 5) → 5.10min (80 : 20) → 7.10min (2 : 98) → 9.00min (2 : 98) → 9.10min (99 : 1) → 17.5min (99 : 1)
MS条件	
イオン化法	ESI-Positive
キャピラリー電圧	1.0kV

表4 水溶性ビタミンのMS/MS分析条件

No.	化合物名	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (eV)
1	Ascorbic acid	177.0	141.0	24	7
2	Thiamine (B1)	265.1	122.1	24	17
3	Nicotinic acid (B3)	123.9	80.0	40	20
4	Pyridoxal (B6)	168.1	150.1	27	15
5	Pyridoxine (B6)	170.1	152.1	28	14
6	Nicotinamide (B3)	123.0	80.0	40	20
7	Ca Pantothenate (B5)	220.1	90.1	30	15
8	Cyanocobalamin (B12)	678.3	147.1	45	40
9	Folic acid (B9)	442.2	295.1	23	17
10	Biotin (B7)	245.1	227.1	35	13
11	Riboflavin (B2)	377.1	243.1	50	25

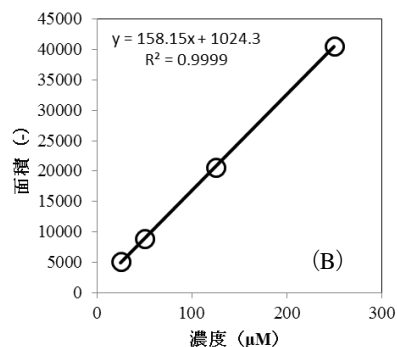
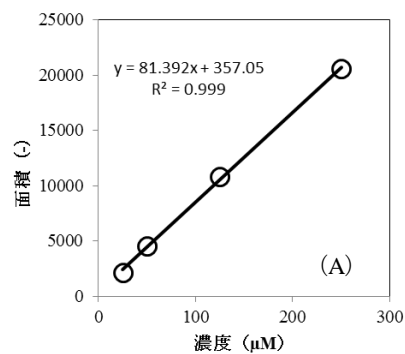


図2 グルタミン酸 (A) , グリシン (B) の検量線

3 結果

3.1 遊離アミノ酸分析

遊離アミノ酸分析の結果として得られたマスクロマトグラム (各遊離アミノ酸 250 μM) を図1に示す. 遊離アミノ酸 18種類のパークは分析時間 10分以内にすべて検出された. また, 分析した中でグルタミン酸, グリシンの検量線を図2に示す. いずれも 25~250 μM の濃度範囲で良好な検量線の直線性が得られた. その他の遊離アミノ酸についても R² が 0.99 以上の良好な検量線が得られた (データは示さず).

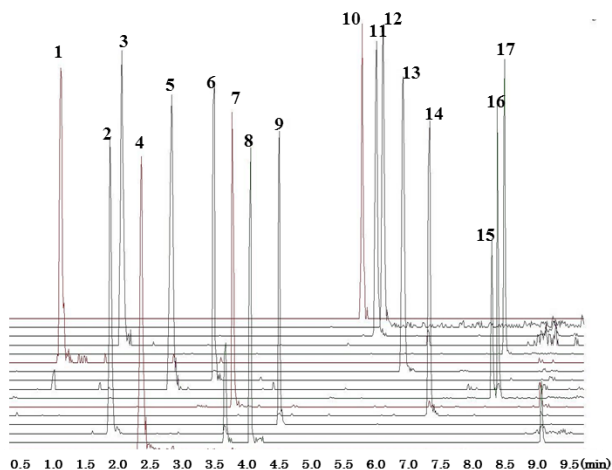


図1 遊離アミノ酸のマスクロマトグラム

3.2 水溶性ビタミン分析

水溶性ビタミン分析の結果として得られたマスクロマトグラムを図3-1, 3-2に示す. 分析時間9分以内に水溶性ビタミン 11種類のパークが検出された. また, 分析した中で B5, B6 Pyridoxine の検量線を図4に示す. いずれも 0.005~0.1 ppm の濃度範囲で良好な検量線の直線性が得られた. その他の水溶性ビタミンについても R² が 0.98 以上の良好な検量線が得られた (データは示さず).

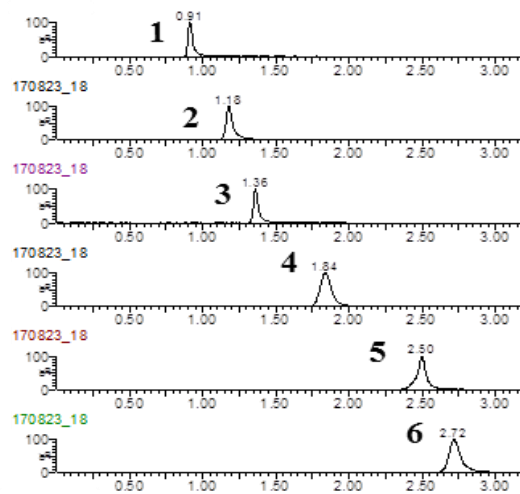


図3-1 水溶性ビタミンのマスクロマトグラム

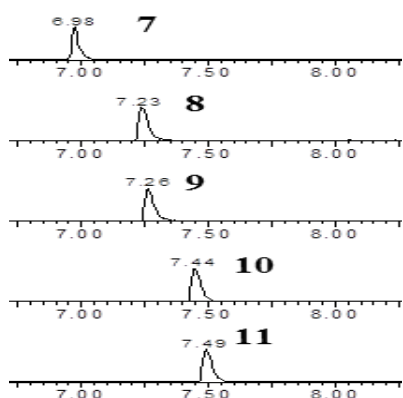


図3-2 水溶性ビタミンのマスククロマトグラム

文献

- 1) 岩永千歳, 森田晃祥, 山根一城; 鳥取県環境衛生研究所報, 40, 6-13 (2008) .
- 2) 亀山真由美; “食品機能性の科学”, (株) 産業技術サービスセンター, 901-910 (2008) .

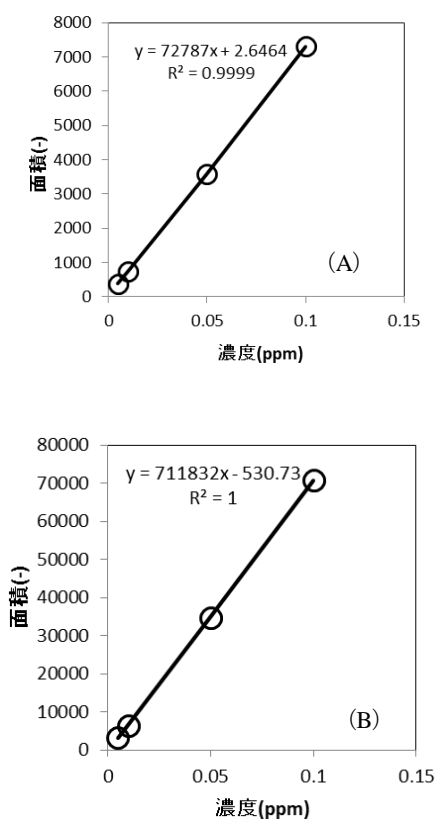


図4 B5 (A) , B6 Pyridoxine (B) の検量線

3 まとめ

従来の HPLC では分析時間が長く、前処理が複雑であった遊離アミノ酸および水溶性ビタミンの分析について、UPLC-MS/MS の使用で簡便かつ短時間に一斉分析を可能にすることができた。今後、UPLC-MS/MS を用いることでより効率的な食品栄養成分分析の支援が可能となる。