SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No.C141

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

クミンおよびスパイスミックス中における ピーナッツアレルゲン物質 Ara h1 の高感度分析

High Sensitivity Analysis of Peanut Allergen in Cumin and Spice Mix [LCMS-8060]

ピーナッツアレルギーが食物アレルギーの中でも特に重篤な症状を引き起こすことから，ピーナッツは食品への表示が法令で義務付けられている特定原材料のひとつに指定されています。

近年，原材料としては含有されていないはずのピーナッツがクミン製品中より検出され大規模リコールとなる事件が欧米で続発しています。消費者の安全を担保するためには，食品中にアレルゲン物質が含まれていないことを確実に示す必要があります。

アレルゲン物質の検出方法としては，主に ELISA 法が用いられておりますが，アレルゲン物質の交差反応性による誤検出が課題とされています。ここでは，トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8060 を用いて，アレルゲン物質であるピーナッツタンパク質 Ara h1 の高感度測定系を構築し，市販のスパイス中から特異的に検出できることを示しました。

T. Tanigawa E. Imoto

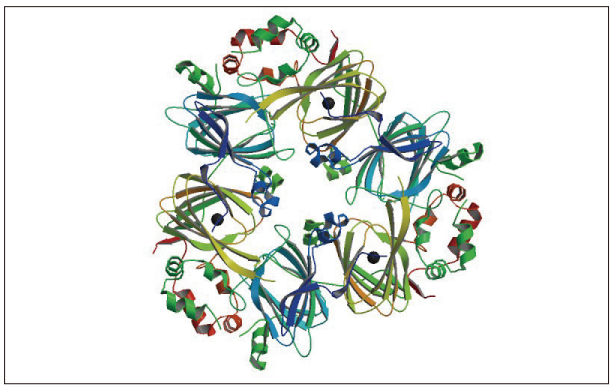

Fig. 1 Ara h1 [3S7I] (68kDa) Vicilin の構造
Structure of Ara h1 [3S7I] (68kDa) Vicilin Like Protein

■実験方法

Sample Preparation

市販のピーナッツパウダー（脱脂済み）を粉砕し液 - 液抽出によりタンパク質を抽出しました。タンパク質を変性し，還元アルキル化処理を行った後，トリプシン消化に供しました。この消化により断片化されたペプチドを定量することで，元のタンパク質の含有量を知ることができます。

様々な食品サンプルにおける特異性および検出感度を評価するため，シナモン，クミン，唐辛子，生姜，ニンニク，カラシ，ナツメグ，ハナハッカ，ローズマリー，セージ，ターメリック，タイムの市販品を試料として，ピーナッツパウダー（2 ppm）を添加したものと非添加のブランク試料とを比較しました。

■ Skyline を用いた MRM トランジションの選択

Selection of MRM Transitions Using Skyline

ピーナッツアレルギーの 95 % は Ara h1 タンパク質に感作しているため，ここでは，Ara h1 の 2 種類の cDNA クローン（P17 および P41B）の情報をもとに，それぞれ特異的に検出可能なペプチドの高感度測定を目指しました。

ターゲットとなるペプチドを測定するための MRM トランジションの選択および最適化を，Skyline ソフトウェア（ワシントン大学・MacCoss Lab）を用いて行いました。合成ペプチドを用いずに行える最適化の流れを Fig. 2 に示します。

最終的に，各クローンに特異的なペプチドを 3 種類ずつと，共通の配列をもつ 3 種類のペプチドを含む 9 種類のペプチドを Ara h1 の検出に最適なものとして選択し，各ペプチドを 3 つの MRM トランジションで測定する分析条件を設定しました（Fig. 3）。

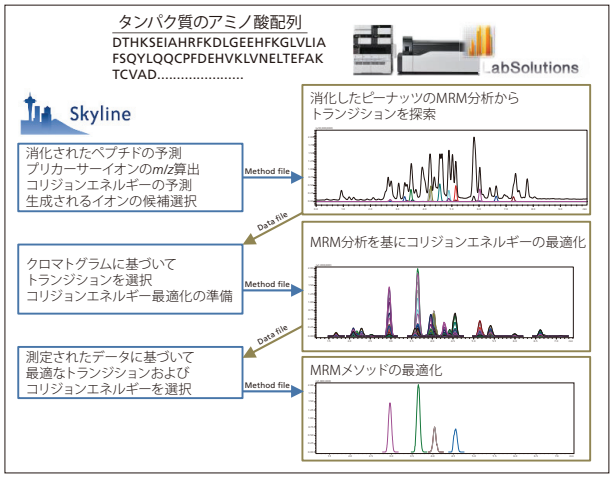

Fig. 2 Skyline を用いた MRM トランジション最適化のワークフロー
Workflow of MRM Transition Optimization Using Skyline

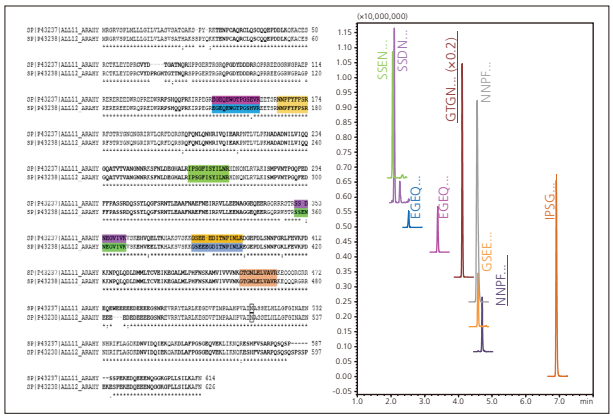

Fig. 3 P17/P41B の配列および 9 種のペプチドの MRM クロマトグラム
AA Sequences of P17/P41B and Nine MRM Chromatograms

Table 1　測定条件
Analytical Conditions

UHPLC	：Nexera X2	LC/MS/MS	：LCMS-8060
分析カラム	：Shim-pack XR-ODS Ⅱ (50 mm L. × 2 mm I.D., 1.6 µm)	イオン化モード	：加熱 ESI
		インターフェース電圧	：+1 kV（ポジティブ）
カラム温度	：40 ˚C	インターフェース温度	：250 ˚C
移動相	：A：0.1 % ギ酸水 B：アセトニトリル	DL 温度	：150 ˚C
		ブロックヒータ温度	：200 ˚C
流速	：500 µL/min	ネブライザガス流量	：3 L/min
グラジエントプログラム	：2 %B (0.00 min) > 25 %B (7.00 min) > 95 %B (7.10-8.00 min) > 2 %B (8.10-10.00 min)	ヒーティングガス流量	：20 L/min
		ドライガス流量	：5 L/min
注入量	：10 µL		

Table 2　MS/MS 取得パラメータ
MS/MS Acquisition Parameters

MRMトランジション	アミノ酸配列	Polarity	Quan	Qual1	Qual2
	EGEQEWGTPGSEVR	+	780.85 > 802.40	780.85 > 644.35	780.85 > 316.10
	NNPFYFPSR	+	571.25 > 669.35	571.25 > 506.25	571.25 > 229.10
	IPSGFISYILNR	+	690.40 > 765.45	690.40 > 211.15	690.40 > 502.25
	SSDNEGVIVK	+	524.25 > 515.35	524.25 > 359.25	524.25 > 175.05
	GSEEEDITNPINLR	+	793.90 > 726.45	793.90 > 612.40	793.90 > 402.25
	GTGNLELVAVR	+	564.80 > 686.40	564.80 > 557.40	564.80 > 444.30
	EGEQEWGTPGSHVR	+	784.85 > 652.35	784.85 > 555.30	784.85 > 316.10
	SSENNEGVIVK	+	588.30 > 515.35	588.30 > 359.25	588.30 > 246.20
	GSEEEGDITNPINLR	+	822.40 > 726.45	822.40 > 612.40	822.40 > 402.25

Dwell 時間	：ループ時間が400 msec以内になるよう，41 msecから130 msecの範囲で設定
停止時間	：3 msec
CIDガス圧力	：300 kPa
分解能設定	：Q1：Unit　Q3：Unit

■インターフェースの最適化
Interface Optimization

ISSS（Interface Setting Support Software，島津製作所）を用いてイオン化におけるパラメータの最適化を行いました。その結果，デフォルトの設定に比べて検出感度が 2 倍以上向上しました。（Fig. 4）

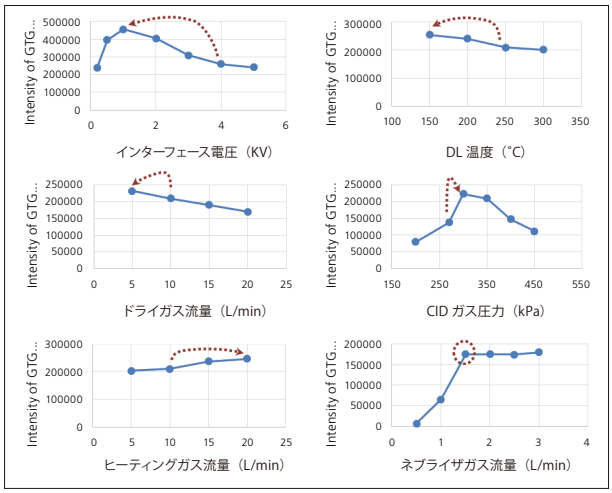

Fig. 4　インターフェースの最適化の結果
Interface Optimization Results

■界面活性剤が与える影響
Effect of Surfactant During Digestion

トリプシン消化中に界面活性剤を加えると，消化効率が向上し，ペプチドの検出感度が向上する場合があります。今回は，界面活性剤を加えることでおよそ 40 % の感度低下が生じました。（Fig. 5）

このため，今回開発した前処理方法では，トリプシン消化中に界面活性剤は用いておりません。

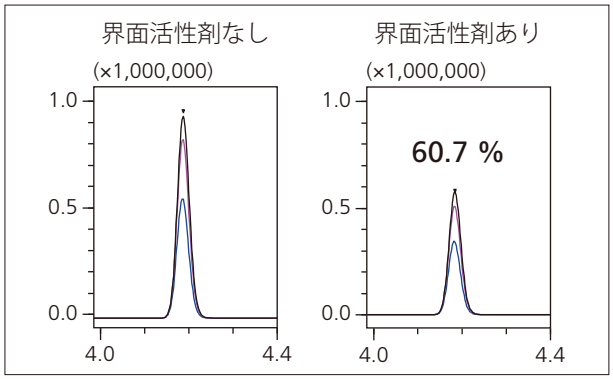

Fig. 5　Ara h1 ペプチド（GTG. . . ）の検出における界面活性剤の影響
Difference of the Chromatograms of Peptide GTG... by Addition of Surfactant

■高い特異性：他のナッツ類に Ara h1 は含まれない

Peanut Allergen in Other Nuts

Ara h1 検出の特異性をテストするため，胡桃，カシューナッツ，アーモンドを試料として，2 ppm（2 mg/kg）のピーナッツパウダーを添加したものと未添加の試料を，それぞれ分析に供しました。結果を Fig. 6 に示します。ピーナッツを添加した試料から Ara h1 ペプチドを検出できたのに対して，添加なしのブランク試料からはピークが検出されず，高い特異性をもつことが示されました。

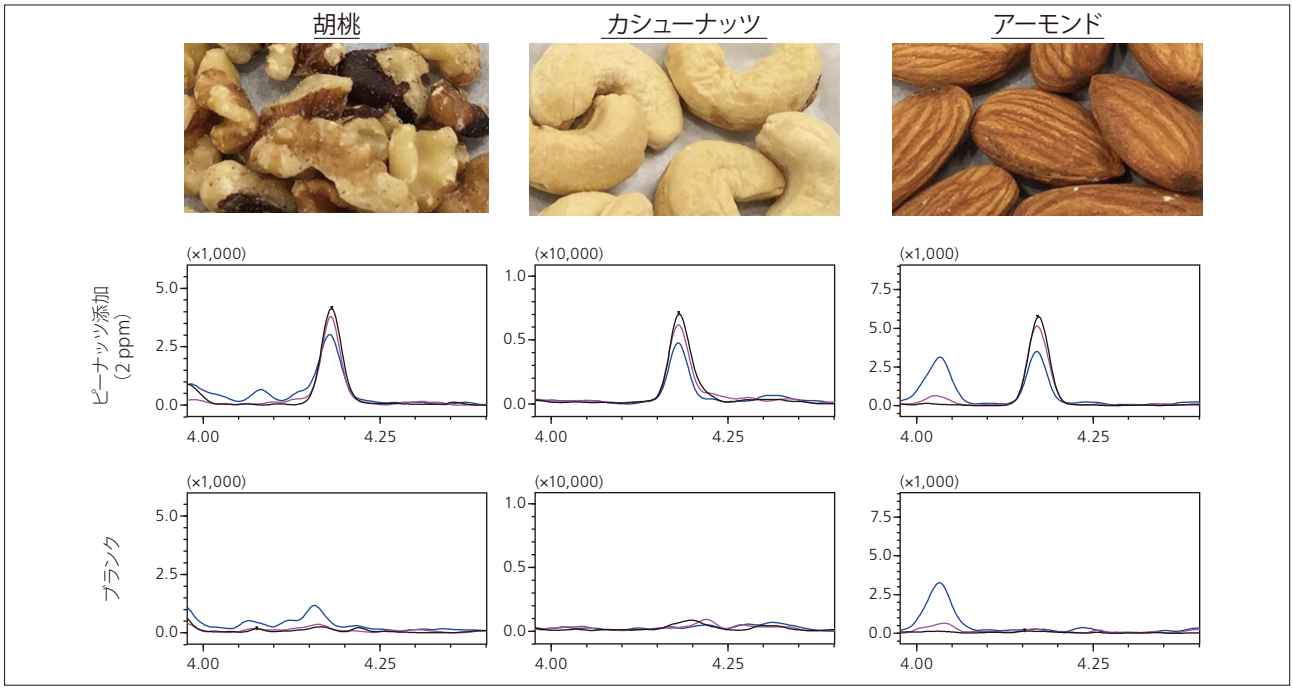

Fig. 6　ピーナッツ（2 mg/kg）を添加した胡桃，カシューナッツ，アーモンドから検出された Ara h1 ペプチド（GTG. . . ）の MRM クロマトグラム
Chromatograms of Peptide GTG... in Other Kind of Nuts With or Without Spiking with Peanuts

■スパイスミックスおよび調味料中の Ara h1 の検出

Detection of ARA h1 in Spice Mixes and Seasonings

数種類のスパイスミックスおよび調味料を本実験手法および分析条件を用いて測定を行いました結果，特定の市販品より Ara h1 ペプチドを検出しました。ここでは，ピーナッツパウダーを添加しておりません。

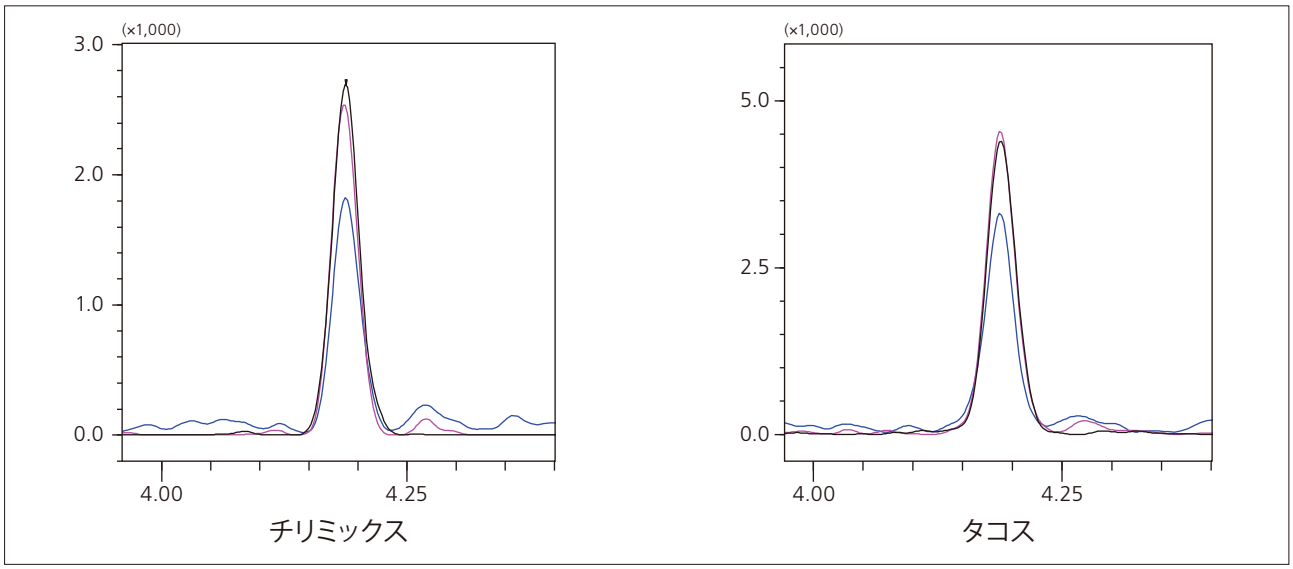

Fig. 7　未添加のチリミックスとタコス調味料より検出した Ara h1 ペプチド（GTG. . . ）の MRM クロマトグラム
Detected Peaks of Peptide GTG... in Chili Mix and Seasoning

■様々なスパイスマトリクスにおける Ara h1 の検出

Peanut Allergen in Spices

極微量のピーナッツパウダー（2 mg/kg）をシナモン, クミン, 唐辛子, 生姜, ニンニク, カラシ, ナツメグ, ハナハッカ, ローズマリー, セージ，ターメリック，タイムに加え Ara h1 の測定を行いました。ピーナッツパウダーを添加した試料からは Ara h1 を検出しました。一方，ブランク試料からは Ara h1 は検出されませんでした。

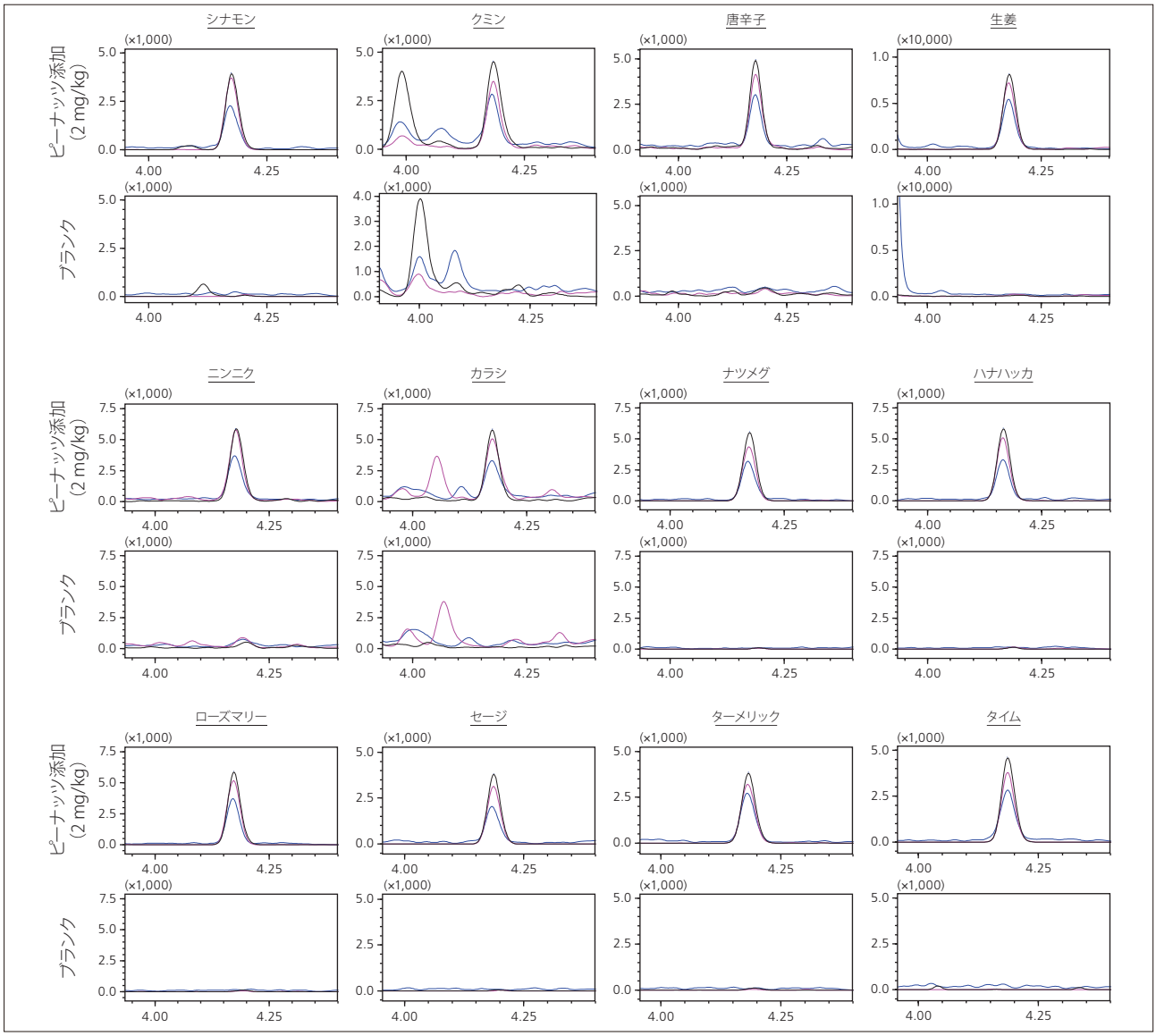

Fig. 8　ピーナッツ（2 mg/kg）添加スパイス試料および非添加の試料における Ara h1 ペプチド（GTG. . . ）の MRM クロマトグラム
Chromatograms of Peptide GTG... in Spices With or Without Spiking with Peanuts

■結論

Conclusion

ピーナッツアレルゲン物質の高感度および特異的な検出を可能にするため，Ara h1 タンパク質の分析手法を開発しました。

開発された手法を用いて，さまざまなスパイスおよび調味料に添加した微量のピーナッツ（2 ppm）を検出しました。

高感度トリプル四重極質量分析装置を用いることで，ピーナッツ以外の多様なアレルゲン物質の分析系も構築することができます。

株式会社 島津製作所　分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2016年11月

島津コールセンター 0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
https://solutions.shimadzu.co.jp/
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。