

トリプル四重極質量分析計を用いた食品中アレルギーの一斉分析法の開発

伊藤 友紀、飯田 哲生

ユーザーベネフィット

- ◆ 特定原材料7成分（小麦・そば・卵・乳・落花生・甲殻類（えび・かに））と特定原材料に準ずるものである大豆アレルギーの一斉分析が可能です。
- ◆ 本分析法を用いることで、加工食品中の食物アレルギーを一斉分析することが可能です

はじめに

食物アレルギーは食品中の特定のタンパク質（アレルギー）に対する過剰な免疫反応によって引き起こされることが知られており、公衆衛生および食品産業における喫緊の課題になっています。食物アレルギーによる健康危害を防ぐため、食品表示について各国で厳密に定めています。日本では過去の健康被害の程度・頻度を考慮し、容器包装された加工食品について、特定原材料8種（小麦・そば・卵・乳・落花生・えび・かに・くるみ）では表示義務が、特定原材料に準ずるもの20種については表示が推奨されています。

現在、ELISA（Enzyme-linked immunosorbent assay）やPCR（Polymerase chain reaction）が検出方法として広く用いられており、これらは比較的簡便な操作によってアレルギー性食品原材料を検出することができます。その一方で、ELISAは交差反応により類似物質を擬陽性として誤検出するリスクが知られています。さらに、ELISAを用いた一斉分析は限定的であり、幅広い食品原材料を検査対象とする場合は異なる測定キットで複数回に分けて測定する必要があります。また、PCRはタンパク質ではなくDNAを検出する手法であるため、牛乳と牛肉を区別することは難しく、またDNAを含まない卵の白身を検出することも困難です。このような背景から、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた食物アレルギーの測定法が、高い選択性と感度、複数のアレルギーに対する一斉分析の可能性から注目を集めています。

本稿では、超高速液体クロマトグラフNexera™ X3とトリプル四重極質量分析計LCMS-8060NX（図1）を用いて加工食品中の特定原材料7成分（小麦・そば・卵・乳・落花生・甲殻類（えび・かに））と特定原材料に準ずるものである大豆アレルギーを一斉分析する方法についてご紹介します。



図1 Nexera™ X3とLCMS™-8060NX

前処理

特定原材料である小麦・そば・卵・乳・落花生・甲殻類（えび・かに）の7成分と特定原材料に準ずるものである大豆アレルギーの標準品は、一般財団法人雑質技術研究所製「食物由来アレルギー抽出物」を使用しました。加工食品は市販のレトルトカレー、ベビーフード、うどんを使用し、各食品のパッケージに記載があるアレルギー情報を表1に記載しました。試料中のタンパク質を抽出した後、還元アルキル化、トリプシン消化、固相カラムで精製し、LC/MS/MS分析に供しました（図2）。

表1 食品のアレルギー情報

加工食品	パッケージに記載のアレルギー
レトルトカレー	特定原材料・大豆の記載なし
ベビーフード	特定原材料・大豆の記載なし
うどん	小麦

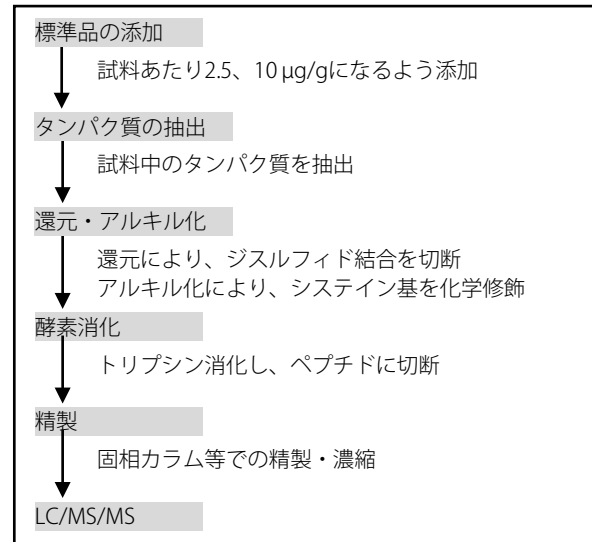


図2 前処理フロー

分析条件

HPLC条件とMS条件を表2に示します。

表2 分析条件

UHPLC (Nexera X3 system)	
Column	: Shim-pack™ GIST-HP C18-AQ [Metal free] (2.1 mmI.D. × 100 mmL, 1.9 µm) P/N: 227-30936-02
Mobile phase A	: 0.1% Formic acid in water
Mobile phase B	: 0.1% Formic acid in acetonitrile
Gradient program	: B Conc. 2% (0 min) → 15% (6 min) → 40% (10.5 min) → 95% (10.65 min) → 95% (12 min) → 2% (13.5 min) → 2% (20 min)
Flow rate	: 0.5 mL/min (0.35 mL/min for 16 min – 18 min)
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 3 µL
MS (LCMS-8060NX)	
Ionization	: IonFocus ESI (Positive)
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 2.0 L/min
Drying gas flow	: 3.0 L/min
Heating gas flow	: 17.5 L/min
DL temp.	: 150 °C
Block heater temp.	: 300 °C
Interface temp.	: 250 °C

■ 特定原材料7成分と特定原材料に準ずるもの 1成分の一斉分析

上述の8成分のアレルゲン性ペプチドを一斉分析するため、17種類のペプチドを対象とした48 MRMトランジションのメソッドを構築しました。8成分のアレルゲン混合標準品を分析したところ、図3(A)に示すようにすべてのペプチドが10.5分以内に溶出し、良好なピーク形状および分離パターンを

示しました。図3(B)には例として甲殻類アレルゲン性ペプチド (AGGLTLER) の直線性についても示しました。表3に今回分析したアレルゲン性ペプチドのMRMトランジションの一覧を示しました。

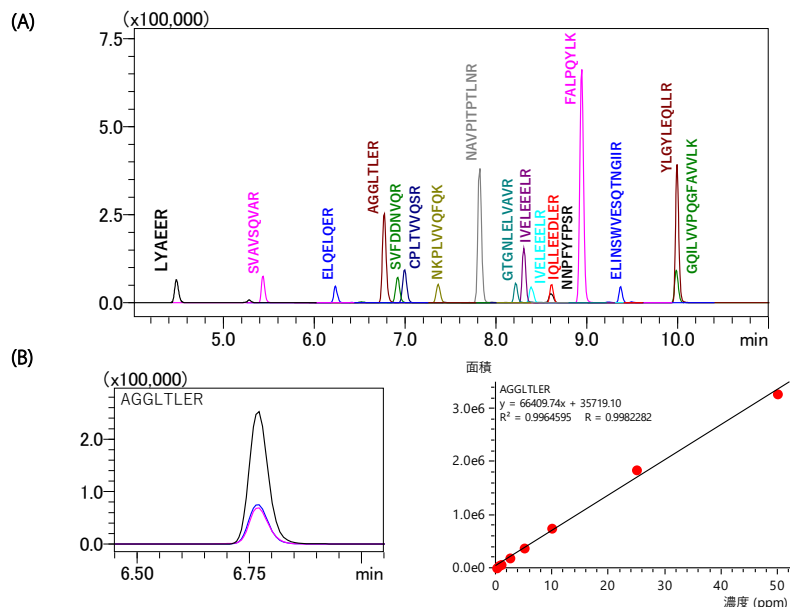


図3 (A)8種類のアレルゲン性食品に由来するペプチド混合物のマスクロマトグラム、
(B)甲殻類由来ペプチドの拡大マスクロマトグラムおよびその検量線 (0.1 – 50 ppm)

表3 測定対象としたアレルゲン性ペプチドのMRMトランジション

Food	Peptides	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (V)
小麦	SVAVSQVAR	458.75	730.40	-16.0
			560.30	-18.0
			802.40	-23.0
そば	SVFDDNVQR	540.00	432.20	-17.0
			746.20	-19.0
			631.10	-21.0
卵	GQILVVPQGFVVLK	784.50	958.60	-23.0
			1057.80	-24.0
			1116.50	-35.0
乳	ELINSWVESQTNGIIR	930.30	888.40	-34.0
			667.10	-15.0
			504.10	-13.0
乳	YLGYLEQLLR	634.35	991.55	-23.0
			771.45	-22.0
			658.40	-24.0
大豆	NAVPITPLNR	598.35	277.15	-20.0
			334.20	-24.0
			911.55	-17.0
大豆	FALPQYLK	490.30	600.35	-25.0
			701.40	-24.0
			648.35	-17.0
大豆	NNPFYPSR	571.25	761.45	-18.0
			832.50	-15.0
			669.35	-25.0
大豆	GTGNLELVAVR	564.80	506.25	-21.0
			229.10	-14.0
			686.40	-19.0
甲殻類 (えび・かに)	IQLLEEDLER	629.35	557.40	-23.0
			444.30	-23.0
			1016.55	-23.0
甲殻類 (えび・かに)	IVELEELR	565.30	903.45	-20.0
			790.35	-23.0
			917.45	-18.0
甲殻類 (えび・かに)	AGGLTLER	408.75	788.40	-21.0
			675.35	-20.0
			518.30	-17.0
大豆	NKPLVVFQK	600.85	745.40	-17.0
			688.40	-17.0
			958.55	-24.0
大豆	CPLTVVQSR	530.30	453.30	-13.0
			649.35	-14.0
			689.40	-23.0
大豆	GIGTISSPYR	582.30	802.50	-23.0
			588.35	-23.0
			722.40	-18.0
大豆	GQILVVPQGFVVLK	784.50	993.55	-21.0
			835.45	-21.0
			958.55	-24.0

■加工食品中のアレルゲンの分析

8成分のアレルゲンの標準品を添加または未添加の食品サンプルをそれぞれ分析し、構築したメソッドを食品サンプルに適用可能か確認しました。今回分析したレトルトカレーおよびベビーフードからはいずれのアレルゲン性ペプチド由来のピークも検出されませんでした。うどんからは小麦由来のピークは検出されましたが、それ以外のアレルゲン性ペプチド由来のピークは検出されませんでした。これらの結果は加工食品のパッケージに記載された内容と一致していました。例として、そばおよび小麦由来ペプチドのマスキンググラムを図4(A)、(B)に示しました。

■まとめ

トリプル四重極質量分析計を用いて、特定原材料7成分（小麦・そば・卵・乳・落花生・甲殻類（えび・かに））と特定原材料に準ずるものである大豆を一斉分析する手法を紹介しました。8成分のアレルゲン性ペプチドを一斉分析するため、17種類のペプチドを対象とした48 MRMトランジションのメソッドを構築しました。3種類の市販の加工食品に含まれるアレルゲンを分析し、パッケージに記載のある通り正しく検出することができました。以上より、本稿で示した分析法は食品中の食物アレルゲンを一斉分析するのに有用であることが示されました。

<謝辞>

本アプリケーションニュース作成にあたり、一般財団法人雑質技術研究所にご協力をいただきました。

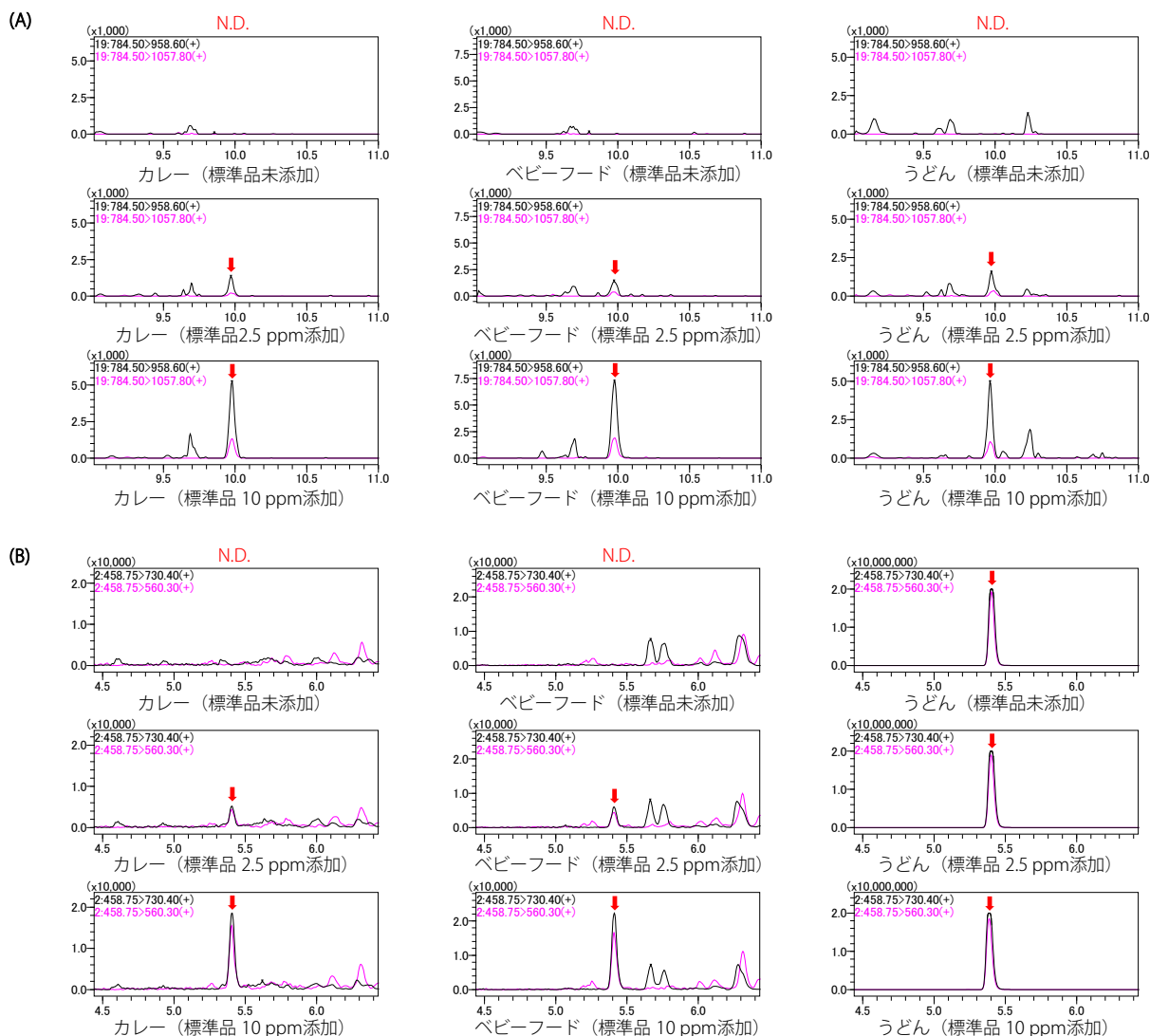


図4 (A)そば由来ペプチドのマスキンググラム、(B)小麦由来ペプチドのマスキンググラム

LCMS、Nexera、およびShim-Packは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

関連製品

一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



> LCMS-8060NX

トリプル四重極質量分析計



> Nexera™シリーズ

超高速液体クロマトグラフ



> LCMS-TQ RX シリーズ

トリプル四重極質量分析計

関連分野

> 食品・飲料

> 食事制限

> 価格お問い合わせ

> 製品お問い合わせ

> 技術お問い合わせ

> その他お問い合わせ