

クロマトグラフィー質量分析法を用いた乳製品中の成分分析

中 島 章 裕

(株式会社明治 研究本部, 〒192-0919 東京都八王子市七国 1-29-1)

Analysis of components in dairy products using chromatographic mass spectrometry

Akihiro NAKAJIMA

(Meiji Co., Ltd., R&D Division 1-29-1, Nanakuni, Hachioji, Tokyo 192-0919, Japan)

要約

クロマトグラフィー質量分析法は、食品等の複雑な混合物中から分離した成分の分子量やマススペクトルが得られる画期的な分析技術で、数千に及ぶ成分を分離検出し、試料間比較等の解析を通じて、これまでとは全く次元の異なる情報が得られる。本稿においては、クロマトグラフィー質量分析法の原理や装置等の概要を示し、食品分野での従来からの代表的な活用例である危害物質分析を中心とした品質管理、最新の測定技術や装置を用いた香気成分、ペプチド、機能性成分等の網羅的分析等について、乳製品での測定事例を紹介した。クロマトグラフィー質量分析法の活用により、これまで知りえなかった成分の情報が、一気に把握出来るようになった。今後、乳製品や食品の機能解明をさらに深く進めていくには、得られた成分の情報と本質的な機能情報とを的確に関連付けることができる解析技術の進展に委ねられている。

1. はじめに

ガスクロマトグラフィー質量分析法（以下 GC-MS）や液体クロマトグラフィー質量分析法（以下 LC-MS）に代表されるクロマトグラフィー質量分析法は、食品の様な多くの成分から構成されている複雑な分析対象物であっても、クロマトグラフィーで個々の成分を分離し、続く質量分析計で成分の重要な固有値である分子量やマススペクトルが得られる画期的な分析技術である。しかし、マススペクトルの解析の複雑さや他の分析装置と比較して高額な装置であることから、汎用の GC や HPLC に比べて特別な存在であった。近年の技術的発達と装置価格の低下、操作性の向上、解析の容易化などの理由

から、食品分析の分野においても徐々に普及が進み、食品中に含まれている有害成分や有用成分の分析に頻繁に使用されるようになってきた。数千に及ぶ成分を分離検出し、それらについて試料間比較をすることが出来るので、食品ごとに異なる様々な現象を科学的に論理的に説明するといった、これまでとは全く次元の異なる情報が得られるようになってきた。

クロマトグラフィー質量分析法は、様々な組み合わせの装置構成がありやや複雑なので、本稿においては、LC-MS、GC-MSを中心に整理して解説し、どのような特徴を持っていて、どのような使われ方をしているのかを紹介する。

2. クロマトグラフィー質量分析法の原理と装置構成^{1,2)}

本稿はやや専門的、技術的な内容を多く含むので、専門外の人でも出来るだけ理解しやすくするため、一部の専門用語を平易な表現で表した。例えば、測定成分のイオンである「プリカーサーイオン」は「親イオン」、イオン化の際に生成する「フラグメントイオン」やプリカーサーイオンを分解させて生成する「プロダクトイオン」は「子イオン（さらに孫イオン）」等と表した。また、観測される「質量電荷比 m/z 」はイオン価数や付加イオンに応じて実際の分子量とは異なる値であるが、観測成分の分子量と直結した方が理解しやすいので、本稿ではすべて「分子量 m/z 」と表した。

2.1 クロマトグラフィー質量分析法の特徴

クロマトグラフィー質量分析法は、検出された成分の重要な固有値である分子量 m/z やマススペクトルが得られるので、クロマトグラム上で複数成分の溶出時間が重なっていても、その分子量 m/z が異なっていれば別のピークとして分離認識できる特異性が最大の特徴である。つまり、LC-MS、GC-MSは通常のHPLCやGCなどと異なり、クロマトグラフィーでの分離と分子量での分離の2次元的な分離ができる極めて特異性の高い分析方法であり、比較的混合物が多く含まれている複雑なサンプルであっても、目的物質が検出可能となる。

さらには、検出された分子量 m/z から分子構造の推定も可能で、特に高分解能なTOF-MSなどによる測定では、精密質量が得られるので、分子式の推定、さらにはフラグメント情報から構造式の推定も可能となる。この様な特徴が、他の分析法と比較して大きな優位性である。

2.2 装置構成

クロマトグラフィー質量分析法に用いる装置は、概ね図1に示す様な装置から構成されている。本項においては、食品分析において多く使用されてい

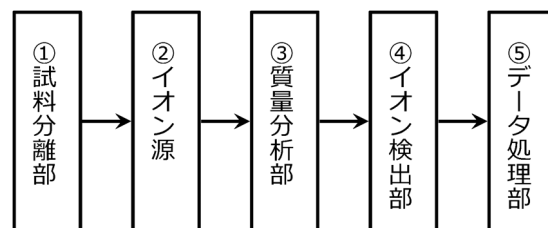


図1 代表的なクロマトグラフィー質量分析装置の構成

- ① LCやGC等により分離する試料分離部
- ② 分離した成分を気化してイオン化するイオン源
- ③ イオンに電場を与え、分離や選別をする質量分析部
- ④ イオンの分子量 m/z を検出するイオン検出部
- ⑤ 検出された信号を処理するデータ処理部

るGC-MS、LC-MSについて、①試料分離部、②イオン源、③質量分析部のそれぞれの特徴について紹介する。

2.3 試料分離部

2.3.1 ガスクロマトグラフィー (GC)

GCは、サンプル中の気化した成分をキャピラリーカラムに導入し、カラムを昇温することにより分離する方法であり、他のクロマトグラフィーに比べ分離能に優れている。対象成分は、分子量が比較的小さい揮発性成分（香気成分、異臭、農薬等）であるが、不揮発性成分（有機酸、アミノ酸、糖等）でも誘導体化により揮発性となれば測定可能である。GC-MSは、装置構成が比較的簡単で分析パラメータも少ないため、装置や測定環境の違い（室間再現性）による測定値への影響が小さい。そのため、世界中で測定した様々な成分のGC-MSの測定データの共有化が進んでおり、膨大なデータベースが構築されている。

2.3.2 液体クロマトグラフィー (LC)

LCは、サンプル中の溶媒に溶解した成分を粒子状のカラムに導入し、移動相を流すことにより分離する方法である。GCと比べて測定対象成分の範囲が広く、不揮発性化合物や低極性から高極性、低分

子から高分子まで測定可能である。一方、カラムの種類や移動相等の分析条件が多岐にわたって複雑であり、GCとは異なり装置性能や測定環境の違いの影響を大きく受けるので、LC-MSの測定データの共有化が難しい。そのため、LC-MSのデータベースは、比較的装置の影響が少ない物質固有のマススペクトルについて、高分解能MS/MSで測定したデータを中心に構築が進められている。

2.4 イオン源

質量分析装置は、分子に電荷を与えてイオン化して電磁場中を運動させると、イオンの質量により運動の違いが生じるので、それを利用してイオンを分離し、質量及びイオンの量（イオン強度）を測定する。分子をイオン化するために様々な方法が考案されており、分子が獲得する電荷エネルギーもイオン化の方法により異なってくる。各イオン化法の特徴を、表1に示す。イオン化時の獲得エネルギーに余剰があるハードイオン化の場合、分子は断片化（フラグメンテーション）を起こしフラグメントイオンを生成する。獲得エネルギーがあまり高くないソフトイオン化の場合は、フラグメントイオンはあまり生成されず、親イオンが出やすい。

2.4.1 EI（電子イオン化：Electron Ionization）

GC-MSでの主流として一般的に用いられている

イオン化。気相状態の分子に電子を衝突させてイオン化する方法で、イオン化効率が高く感度が良いが、イオン源の中で分子イオンが壊れるフラグメンテーションが起りやすいハードイオン化に分類される。

測定の基本条件であるイオン化電圧が、一般的に70 eVでほぼ統一されている。70 eVという電圧は比較的強い条件なので、多くの物質は親イオンが分解してしまいフラグメントイオンを多く生じる。このフラグメントイオンのパターンをマススペクトルと呼び、それぞれが物質特有の情報である。世界中で測定された膨大な成分についてマススペクトルのデータベースが構築されており、成分探索のライブラリーとなっている。

2.4.2 CI（化学イオン化：Chemical Ionization）

GC-MSで用いられているイオン化。イオン化したメタン、アンモニア等に試料を衝突させてイオン化する方法。ソフトイオン化に分類され、フラグメンテーションが起りにくく親イオンが出やすく、分子量情報を得たい場合に適している。

2.4.4 APCI（大気圧化学イオン化：Atmospheric Pressure Chemical Ionization）

GC-MSとLC-MSの両方で用いられているイオン化。気化したサンプル溶液とネブライザーガスを

表1 イオン化法の特徴

イオン源	EI	CI	APCI		ESI
クロマトグラフィー	GC	GC	GC	LC	LC
測定対象	気体	○	○	×	×
	揮発性物質	○	○	○	×
	低揮発性液体	△	△	△	○
	熱不安定物質	×	×	×	○
	極性	低極性	低極性	低-中極性	
分子量	1000以下	1000以下	5000以下		低分子から高分子
イオン化	ハード	ややソフト	ややハード		ソフト
フラグメントイオン	生成	少ない	若干生成		ほぼ生成しない
定量性	○	△	○		○
その他特徴	データベース充実		マトリックスの影響あり		マトリックスの影響大 多価イオンが生成

混合し、コロナ放電によって生成したイオンとサンプルとのイオン分子反応によってイオン化する方法。

2.4.3 ESI (エレクトロスプレーイオン化: Electro Spray Ionization)

LC-MSの主流として用いられているイオン化。電界をかけたノズルから試料の溶液を噴霧し、同時に高温の乾燥窒素ガスを当てて微小液滴中の溶媒を蒸発させてイオン化する方法。低分子から高分子まで測定可能で汎用性が高い。ソフトイオン化に分類され、親イオンが出やすい。イオン化の際には、夾雑する他の成分にイオン化エネルギーが奪われて、目的成分のイオン化が阻害される「マトリックス効果」が起きやすいのが欠点。

2.5 質量分析部

電磁場中でのイオンの運動の違いで質量分離するのが質量分離部であり、質量分析装置の主要部である。様々な原理に基づく装置が考案されている。クロマトグラフィー質量分析法で主に使われている3種分析計と構成の特徴を表2に示す。

2.5.1 四重極質量分析計 (Quadrupole, Q)

一般に「四重極 (しじゅうきょく)」と呼ばれており、+と-に帯電した2対の向かい合わせの4本の棒状の電極である。比較的価格が安いので、多くの質量分析装置で一般的に用いられているが、質量分解能は低く、識別できる質量差は0.5 Da程度である。印加した高周波電圧に応じ、特定の分子量 m/z を持つイオンのみを選択的に通過させること

が出来る。通過できる m/z は高周波電圧 V に比例するので、高周波電圧 V を0から上げていくと、低い m/z のイオンから順番に検出 (Scan) することもできる。

2.5.2 飛行時間型質量分析計 (Time-of-Flight, TOF)

一般に「トフ」と呼ばれており、煙突の様な形状のフライトチューブ中をイオンが飛行する。イオンの飛行時間は分子量 m/z により異なり、一定の加速電圧で加速されたイオンがフライトチューブ中を飛行する時間は、 m/z の1/2乗に比例する。質量分解能が高く、フライトチューブが長いほど測定できる質量は精密になり、識別可能な質量差は0.025 Da程度である。

2.5.3 電場型フーリエ変換質量分析計 (Orbitrap)

現在はサーモフィッシャー・サイエンティフィック社からのみ発売されており「オービトラップ」と呼ばれている。中心電極の周りを周回運動するイオンの周回速度が質量によって異なることを利用して、イオンの周回により生じる誘導電流の周波数をフーリエ変換して質量スペクトルを得る。質量分解能が極めて高く、識別可能な質量差は0.001 Da程度である。

2.5.4 シングル MS

一般に「マス (又はエムエス)」と呼ばれている。構成は、イオン化部と1つの質量分析計で構成。GC-MS, LC-MSと示す場合は、一般に質量分析

表2 質量分析計の特徴

	MS		MS/MS		
	シングル Q	TOF	トリプル Q	QTOF	Orbitrap
質量分解能	×	○	×	○	◎
ダイナミックレンジ	○	△	◎	△	△
scan 速度	△	◎	△	△	△
価格	低	中	中	高	高
主な用途	定量	高速分析 スクリーニング	微量成分 の定量	未知化合物 の構造解析	未知化合物 の構造解析

部が四重極であることが多い。質量分析部が TOF の場合、GC-TOF、LC-TOF と表すことが多い。

2.5.5 MS/MS

一般に「マスマス」と呼ばれている。構成は、イオン化部と 3 つの質量分析計で構成。

(1) トリプル四重極 (トリプル Q)

3 つの四重極が直列に配された構成であり、MS/MS と表す場合は、一般的にトリプル四重極を指すことが多い。3 つ並ぶ四重極のうち、1 段目の四重極 (Q1) はイオンを選択する最初のフィルター。2 段目の四重極 (q2) はコリジョンセル (衝突室) と呼ばれ、イオンを分解するためのセル。3 段目の四重極 (Q3) は測定するイオンを選択する。

(2) QTOF

2 つの四重極 (Q1, q2) に続き 3 段目が TOF である MS/MS で、一般に「キュートフ」と呼ばれている。1 段目 2 段目の四重極の役割は、トリプル四重極とほぼ同じ。3 段目が高分解能な TOF-MS なので、測定されたイオンの精密質量が得られる。

2.6 測定技術、解析技術

2.6.1 MRM (Multiple Reaction Monitoring : 多重反応モニタリング)

トリプル四重極が得意とする技術。イオン化部でイオン化されたさまざまなイオンについて、Q1 で特定の親イオン (プリカーサーイオン) を選択し、

q2 (コリジョンセル) の中で不活性ガスとの衝突による開裂反応を起こし (衝突誘起解離)、開裂によって生じたイオン群 (プロダクトイオン) の中から Q3 において特定のイオンを選択する方法 (図 2)。多くの場合 q2 での分解によって生ずる子イオンは成分毎に異なるので、夾雑物は Q3 を通過できず検出されない。つまり、親イオン—子イオンの m/z 値の組み合わせ (トランジション) が一致しないと検出されないので、極めて選択性が高い。実際の測定では、トランジションを複数設定 (図 2 の例では○成分由来の 500-350 と 500-150 等) することにより、物質の検出や特定の確度を上げている。q2 にかけるコリジョンエネルギー (CE) によっても分解のパターンが異なるので、CE も成分特有の重要な情報である。

2.6.2 デコンボリューション

サンプル精製が難しい場合やノンターゲット分析 (特定の成分に限定しない分析) の際には、多くの場合、同一の保持時間に共溶出した複数の成分が検出される。デコンボリューションは、得られたクロマトグラムの複数の成分が重なり合った複雑なピークから、数学的手法により個々のピークを構成するマススペクトルのみを抽出する技術である。デコンボリューションにより得られるピーク固有のスペクトル情報は、ライブラリー照合率の向上や精密質量測定時のより正確な組成式算出を可能とする。多少

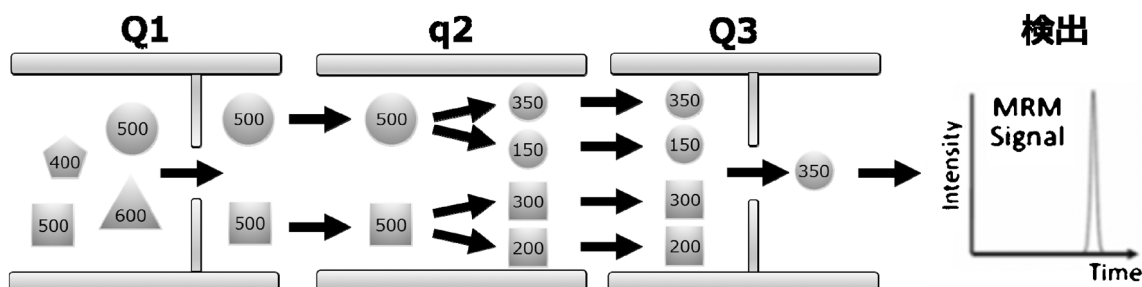


図 2 MRM 法の原理

Q1 : 測定対象成分 (○) の親イオンと同じ分子量 (500) のみ通過

q2 : 通過した成分を分解 (○は 350 と 150 に分解, □は 300 と 200 に分解)

Q3 : 測定対象成分の子イオンのみ (○成分由来の 350) を通過させ検出

夾雑成分由来 (□成分由来の 300 と 200) は Q3 を通過できず検出されない

ピークが重なり合っている場合、ピークトップがズレていけば算術的にピーク分離することが可能だが、保持時間が完全に一致した成分は分離できない。

2.6.3 データベース

GC-MS や LC-MS で取得したマススペクトルは、その成分の構造に由来した固有の情報であるので、マススペクトルデータを集めたデータベースを用いた検索を行って、成分の構造推定が行われている。

GC-MS については、古くからイオン化の主流が EI であり、分析条件も標準化されて、過去に測定された多くの既知物質のマススペクトル（フラグメントイオンのパターン）を集めたデータベースが充実している。分析対象のマススペクトルと類似するマススペクトルをデータベースから抽出し、類似度の高い順にリストアップし、その結果から GC の保持指標、分析対象試料の周辺情報などと矛盾しない物質を選んで、分析対象の構造を推定する。有料の NIST³⁾、Wiley⁴⁾等の他に、メタボロミクス系の METLIN⁵⁾等が成分数も多く有名なデータベースである。

一方、LC-MS の場合は、主にソフトイオン化である ESI なので、シングル MS では親イオンが検出され、構造推定するだけの情報に乏しい。ここから分子の化学構造情報を得るためには、分子を開裂させた子イオンを生成させるトリプル四重極質量分析 (MS/MS) を用いる必要があるが、MS/MS の分析条件を標準化できず、本格的なデータベースの構築に制約がある。しかしながら、比較的構造が分かり易く解析しやすいたんぱく質ペプチドに関しては、データベース化が進んでおり、ペプチドの MS/MS スペクトルがあれば、フリーデータベースの MASCOT⁶⁾でアミノ酸配列を推定することが出来る。更には高分解能 MS/MS での測定データを中心に構築した MassBank⁷⁾をはじめとして、様々な MS/MS データベースの構築が進められている。

3. 品質管理での活用

食品分野におけるクロマトグラフィー質量分析法は、品質管理、食の安全の観点等から目的外成分である有害物質（農薬、動物用医薬品）や臭気成分の分析に多く活用されてきた。近年は、一通り有害成分分析への対応が進んだことや、分析装置の技術や解析技術の進歩等から、おいしさ研究、香気成分分析、機能性成分探索に活用されるようになってきた。

3.1 乳製品中の有害物質分析

3.1.1 GC-MS, LC-MS/MS による農薬、動物用医薬品等の一斉分析

2006年の食品中の残留農薬、動物用医薬品、飼料添加物のポジティブリスト制の施行に伴い、乳における規制対象品目が施行前の約30品目から約800品目へと飛躍的に拡大した。乳の安全性の確保に向け、農薬などの管理を科学的に検証するための簡便かつ迅速な残留スクリーニング法として、GC/MS 及び LC-MS/MS を用いた一斉分析法が一般化した。斎藤らが報告⁸⁾した牛乳中の残留農薬、動物用医薬品の分析法では、農薬272、動物用医薬品70が一斉分析可能となった（表3）。

最新の LC-MS/MS 法では、QuEChERS 法⁹⁾等の非常に簡便で最小限のサンプル調製で、このような規制された化合物を非常に低濃度での検出が可能であり、多検体中の多成分の迅速な分析が可能となっている。LC-MS/MS 法は、これらの領域に関連するほぼ全ての検査機関において、必要最低条件とみなされており、通知法¹⁰⁾でも MS を用いた一斉分析が主流となっている。

表3 各測定条件で検出できた成分数

装置	イオン化	農薬	動物用医薬品
GC-MS	EI	56	—
	CI (Negative)	130	—
LC-MS/MS	ESI (Positive)	81	51
	ESI (Negative)	27	19

参考文献8)より引用

3.1.2 MRM データベースを用いた品質事故への備え

食品への農薬等の危害物質の混入事故に迅速に対応するためには、GC-MS を用いる場合、混入が予測される危害物質の標準品を常に保管管理し、混入事故品から検出された成分ピークと多数の標準品ピークを照合することで、混入成分の特定をおこなう。しかし、妨害イオンを排除し、よりユニークなイオンを選別し検出できる GC-MS/MS の MRM 法を用いれば、マトリックスが多いサンプルに対して高感度高選択的な測定が可能となる。更に、危害物質の MRM 情報をデータベース登録しておけば、その成分の標準品がなくても混入成分の推定が出来るため、混入した成分を特定するための迅速簡便な 1 次スクリーニングとしても有用である。

MRM 法での分析パラメータである① Q1 を通過させる親イオン（プリカーサーイオン）、② q2 で分解させるコリジョンエネルギー（CE）、③ Q3 を通過させる子イオン（プロダクトイオン）の MRM 情報と、④クロマトグラフィーでの保持時間を加えた 4 つの情報が一致すれば、その物質である確率はかなり高くなる。最近の GC-MS/MS は、例えば 30 分間の測定時間で約 400 化合物の一斉分析が可能なので、予め測定対象となる化合物の名称、測定条件、MRM 情報①～④等をデータベース化し、測定メソッドと定量解析メソッドを自動生成するようしておけば、多大な省力化、精度向上、ラボの生産性向上につながる。また、データベース化により標準品がなくても物質の推定が出来るので、数多く標準品の保管管理からも解放される。

(1) Intelligent MRM を用いた生乳及び牛乳中の農薬の一斉検出

アジレントテクノロジー社から 2011 年 10 月にリリースされた Intelligent MRM には、農薬や香気成分、法医学など各分野ごとに数百の化合物の測定条件と、MRM 情報①～④等がデータベース化されており、それまで数日かかっていた数百化合物の一斉分析メソッドの作成が、ほぼ全自動で数分間で完

了できる。更に、変動しやすい保持時間を高い精度で再現出来るリテンションタイムロッキング¹¹⁾等の独自の技術も含まれており、検出された成分が高い確率で推定可能になっている。また、Intelligent MRM は Excel ファイルで作成されているので、化合物やトランジションの追加や編集が簡単にできる。残留農薬用のほかに、異臭分析用、メタボロミクス用などが提供されており、これらは随時更新されている。

筆者らは、林純薬工業製の混合農薬標準溶液（PL2005 農薬 GC/MS Mix I～VII：354 農薬）を用いて、各農薬を 0.1 ppm 相当になるように生乳及び牛乳に添加し、STQ 法¹²⁾で前処理したのち、アジレントテクノロジー製 GC-MS/MS（Agilent 7000C）にて Intelligent MRM メソッドを用いて測定を行った。その結果、生乳及び牛乳のいずれからも測定当時の Intelligent MRM に登録されていた 347 農薬のうち、約 97% に該当する 336 農薬を一斉に検出することが出来た。

3.1.3 アレルゲン分析

食物アレルギーは、抗原たんぱく質に対する免疫が原因の有害反応で、抗原への曝露がたとえわずかであっても、敏感な人は重大な反応（発疹、口内のそう痒、腫脹、悪心、嘔吐、喘息等）が生じ、更に、死亡のおそれがある急性アレルギー反応であるアナフィラキシーを引き起こす場合がある。しかし、食物アレルギーに対する治療方法はなく、アレルギーのある人はアレルゲンを摂取しないように食品の包装の表示に頼らざるを得ない。このため、生命を脅かすような食物アレルギーを予防するには、高感度かつ正確な分析法で食品中のアレルゲンの有無をスクリーニングすることが不可欠である。

(1) LC-MS/MS によるアレルゲンスクリーニングメソッド

アレルゲンのスクリーニングに最も多く使われている検査法は、ELISA 法（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays）であるが、抗原抗体反応を

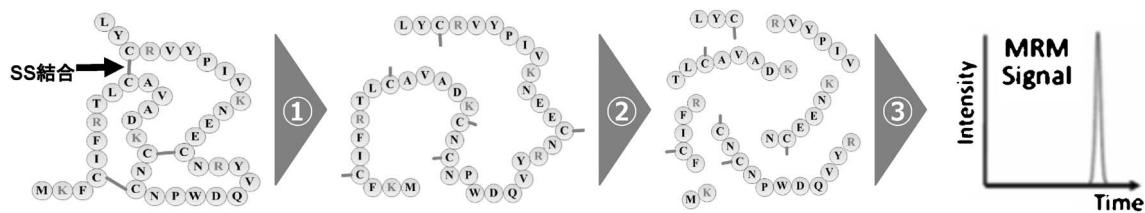


図3 ショットガンプロテオミクスの原理

- ① アレルゲンタンパク質のSS結合を切断
- ② トリプシン処理でリジン (K)、アルギニン (R) で切断
- ③ アレルゲンタンパク質に特異的な配列を持つペプチドをMRMで検出

利用しているため、偽陽性や偽陰性の結果を生じる可能性がある。さらに、ELISA法の多くは1回に1種のアレルゲンしか検出できないため、食品中の複数のアレルゲンを検査する場合には、複数回検査しなければならない。このような弱点を補うために、ショットガンプロテオミクスの技術¹³⁾を応用し、アレルゲンタンパク質を酵素(トリプシン)処理したペプチド断片をLC-MS/MSのMRM法により一斉分析する方法が開発された(図3)。

LC-MS/MS法はELISA法とは異なり、各アレルゲンタンパク質由来の複数ペプチドを同時に検出できることから、偽陽性や偽陰性の結果を生じる可能性が低下し、同一の食品サンプルから複数のアレルゲンを明確に確認できるため、食品の品質管理に非常に有用である。

これらのMRM情報をデータベース化したLC-MS/MS用高感度分析メソッドが、SCIEX社より市販されている。このメソッドは、AOAC INTERNATIONALからFirst Action Official Method (FAOM)として認定されており、食物アレルゲン13種(牛乳、卵、ピーナッツ、大豆、ナッツ類)の特異的なトリプシン消化ペプチドのMRM情報が登録されている。乳製品を初めとする様々な食品中に混入したアレルゲンを1回の測定で検出(検出限界: 10 ppm)が可能となっている。

4. 風味、機能性研究での活用

4.1 GC-MSによる乳製品中の香気成分分析

食品に含まれている香気成分を把握することは、

おいしさの追求、高付加価値製品の開発による差別化など、様々な目的において重要である。それには可能な限り網羅的に成分を同定し、効率よく解析することが必要であるが、食品に含まれる香りは、香気成分が数百種以上含まれ非常に複雑である。このようなサンプルについて網羅的分析を行った場合、クロマトグラム上では十分に分離できずいくつかのピークが重なり合うが、分子量 m/z で分離できるのがMSの強みである。そのため、揮発性成分である香りの分析には、主にGC-MSでの測定が選択される。しかし、GC-MSのイオン化の多くはハードイオン化であるEIであるため、その高いイオン化エネルギーにより、親イオンは分解して小さくなり、逆に数多くのフラグメントイオンが生成することが多い。クロマトグラム上で重なったピークは、それぞれに数多くのフラグメントイオンが生成し妨害し合い、目的物のデータベース検索の正解率が低いことが多々ある。

このような状態を改善する方法として、①クロマトグラムでの分離を向上、②MSでのソフトイオン化が開発されている。

4.1.1 クロマトグラムでの分離の向上：2次元GC-MS

クロマトグラムでの成分分離を画期的に向上させる方法として、2次元クロマトグラフィーの技術が開発されている。2次元GC (GC×GC)は、1次元カラムで分離された溶出成分を、2次元カラムの入り口で一定時間コールドトラップし、2次元カラムに注

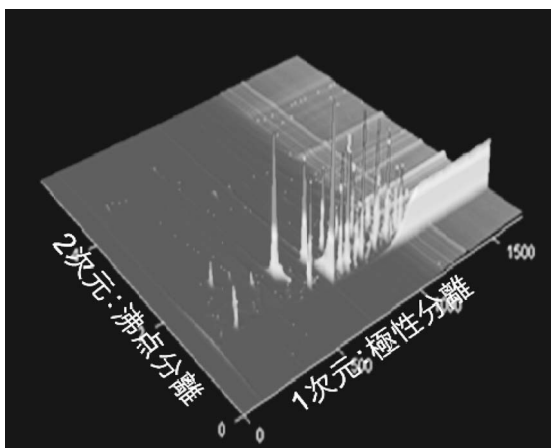


図4 2次元 GC-MS のクロマトグラム
(LECO ジャパンより提供)

入して再度分離する方法である。例えば、1次カラムに極性、2次カラムに無極性のカラムを使用して測定した場合、2次元のクロマトグラム上には、1次カラムでは極性順（横軸）に溶出し、2次カラムでは沸点順（縦軸）に溶出した成分がプロットされる（図4）。

この様に異なる極性のカラムを組み合わせた GC×GC-MS は圧倒的分離能を持つため、分離されたピークは単一ピークである確率が増え、単一ピークでなくても、重なるピーク数が激減するので、デコンボリューションの正確性が増す。多くのピークから夾雑イオンのない正確なマススペクトルが得られるので、高い精度でライブラリーとの照合を行うことができ、データベースのヒット率が格段に向上する。

(1) GC×GC-TOFMS でのチーズの香気分析

3種のクリームチーズ（ナチュラルチーズ：国産、フランス産とプロセスチーズ：デンマーク産）について、香気成分の分析を LECO 製 GC×GC-TOFMS (Pegasus 4D-C) で測定を行った。2本の極性異なるカラムを用いた GC×GC の高分離により、通常の GC-MS では分離困難な共溶出成分のイオンが取り除かれた約1000ピークを検出した（図5）。自動解析システムにより、デコンボリューションされた各ピークのマススペクトルは、ライブ

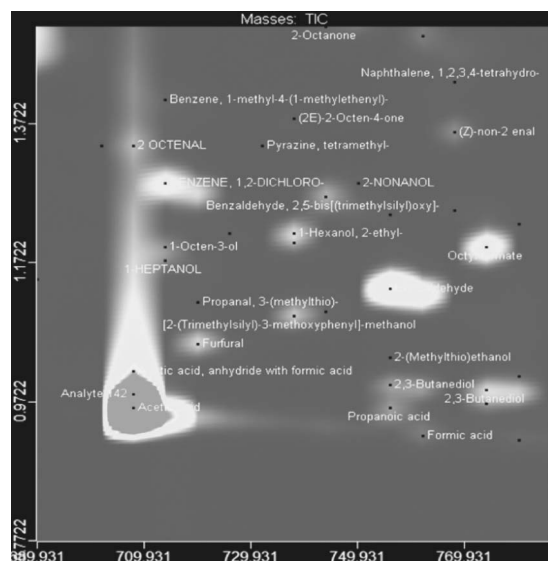


図5 チーズの香気成分の2次元クロマトグラム
(LECO ジャパンより提供)

ラリー一致率93.9%と極めて高いヒット率が実現した。

GC×GC-TOFMS の高い分離能は、香気成分のような複雑なクロマトグラムの詳細を把握し、包括的なキャラクタリゼーションに有用である。GC×GC データと統計解析を組み合わせることにより、膨大な情報の中から、従来のマニュアル解析では見出すことが困難なサンプルの細かな特徴を抽出することが可能となる。

4.1.2 新しいソフトイオン化：GC-APCI

フラグメンテーションを伴わず、高感度で幅広い化合物に適応可能で、同じソフトイオン化である CI と比べて装置汚染が少ない GC 用のイオン化法として、大気圧化学イオン化法 (APCI) が開発された。APCI は EI よりもマイルドなイオン化で、親イオンが優位に残存しやすく、MS/MS との相性が良い。優位な親イオンで MRM を組むことで、MRM の高感度高選択性の特徴を活かして、多くの夾雑成分の中から微量な特定成分の検出定量が出来るようになる。

(1) GC-APCI-MS/MS による高い特異性

MRM 法は、本来「親イオン→子イオン」の組み

合わせ（トランジション）が理想的であるが、EIなどのハードイオン化で親イオンが強く分解してしまると、わずかに検出された親イオンで組んだMRM トランジションでは感度が得られない。このような場合は、「子イオン-孫イオン」等の組み合わせにしてMRM測定を行う。しかし、類縁物質などの構造が類似した化合物は、共通構造のフラグメントイオン（子イオン）しか検出できない場合も多い。

例えば、図6に示す類縁物質である Oxychlordane と Heptachlor epoxide B は、EI ではそれぞれの親イオンは分解するため、子イオンでMRM トランジションを組む必要がある。両成分は類縁物質のため、子イオンは同じ構造であり、「子イオン (m/z : 235)-孫イオン (m/z : 141)」で組んだトランジションでは区別されずに、両成分とも検出される。GCの保持時間も近く、GC-EI-MS/MS では両成分を明確に区別することは難しい。

一方、APCI の場合は、イオン化の際に分解が抑えられて検出される親イオンは強いので、Oxychlordane は「親イオン (m/z : 421)-子イオン (m/z : 151)」のトランジションを組むことができる。この条件では Heptachlor epoxide B の親イオン (m/z : 389) は Q1 を通過できないため検出されず、

MRM測定で2つの類縁物質を明確に区別することが出来る。

(2) GC-APCI の可能性

APCI をイオン源とした GC-MS は、APGC として Waters 社から市販されている。Waters 製の MS は、イオン化モジュールの脱着が容易で、1台の MS を HPLC と GC で共有化すると、LC-ESI-MS から GC-APCI-MS (APGC) への切り替えが簡単にできるため、測定対象成分が GC で低極性、揮発性化合物から、LC で高極性、不揮発性、高分子化合物まで幅広く測定することができる。特に非常に高価な QTOF-MS 等の精密質量 MS との組み合わせれば、GC と LC の両方において様々な未知試料の構造解析が可能となる。

一方で、イオン化の原理が EI とは異なるため、充実した GC-EI-MS のデータベースが活用できないのが現時点での弱点である。しかし、EI のデータベースの大半が四重極 MS で測定したものであり、今後の TOF-MS 等の精密質量 MS が主流となったときに、これらデータベースがどの程度使えるかは判らない。APGC は ESI と同様に、親イオンが出やすく q2 で分解することが出来るので、現在 LC-MS で構築整備が進んでいる MS/MS のデータ

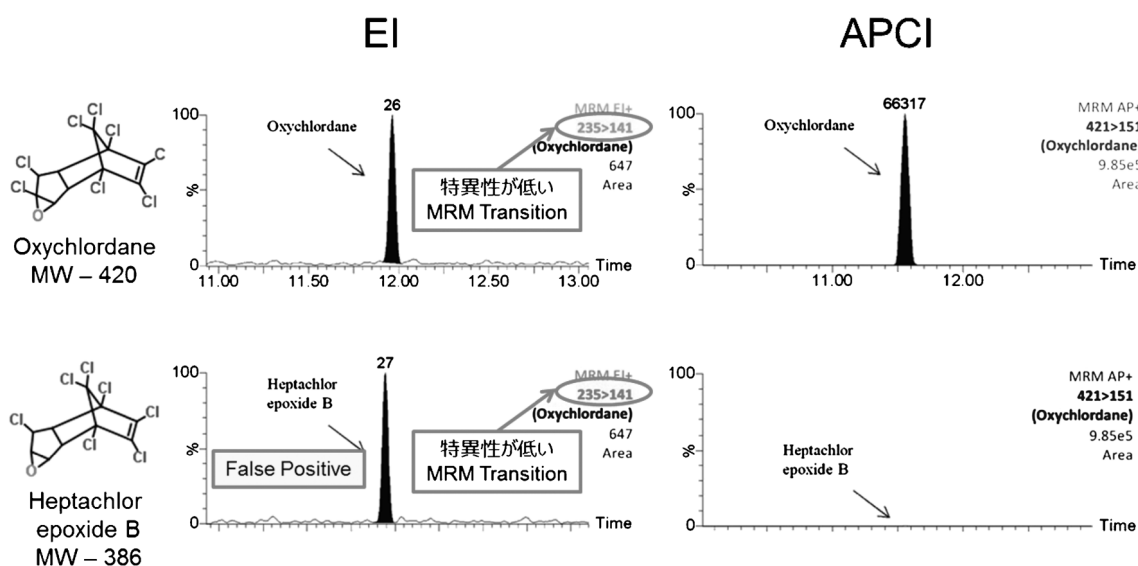


図6 特異性が高い APCI (大気圧化学イオン化法) での MRM 法 (日本ウォーターズより提供)

ベースが共有化できれば、将来の主流の分析装置となる可能性を秘めている。

(3) APGC でのバターの香気分析

5種のバター（フランス産バター、ニュージーランド産バター、ニュージーランド産廉価バター、バター風マーガリン、マーガリン）について、香気成分を Waters 製 APGC-QTOF (Xevo G2-XS QToF) を用いて網羅的に分析した。それぞれから数百~数千のピークが検出され、それらを解析ソフト Progenesis QI を用いてデータ処理と多変量解析（主成分分析）を行った。その結果、5種のバターとマーガリンはそれぞれ群分けされ、更にバター群とマーガリン群に大きく2群に分かれた。

4.2 乳製品中の機能性成分分析（フードミクス）

フードミクス（食品メタボロミクス）は、食品中の代謝物を網羅的に測定するメタボローム解析（メタボロミクス）技術の一つである。クロマトグラフ質量分析法を用いて、食品中の化学的性質が異なる様々な分子種（糖、アミノ酸、有機酸、脂質など）を同時計測し、複数サンプルの多彩な成分プロファイルを把握、比較して、食品の品質管理・鑑定や要因解析などに展開する新たな手法である。食品の機能性研究の分野では、汎用されている単一成分評価法と比べて、遥かに多くの有用情報を得られる

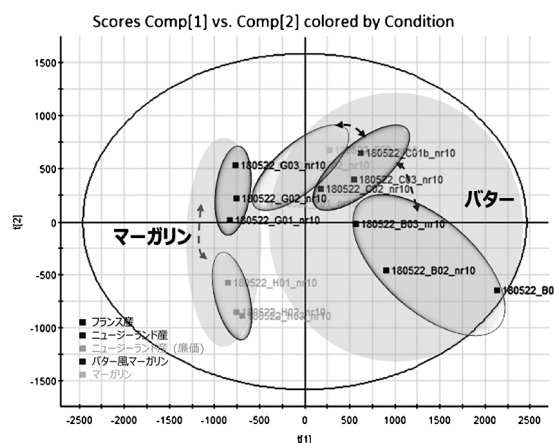


図7 バターの主成分プロット図
（日本ウォーターズより提供）

ため、複数のサンプル間の類似性や相違性を見出し、食品の機能性評価の有用な解析ツールとなることが期待されている。

4.2.1 代謝物の網羅分析

メタボロミクスの対象成分の多くは揮発性の弱い低分子成分が多く、そのままでは GC-MS には適さない成分である。しかし、GC-MS は比較的簡単な操作で再現性の高いデータが得られる等、他の方法に比べて優位性があることから、弱揮発性成分を誘導体化して揮発性成分として GC-MS で測定する技術が確立されている。

(1) Smart Metabolites Database を用いたヨーグルト中の代謝物分析

島津製作所の Smart Metabolites Database は、生体試料中の代謝物が登録された GC-MS/MS のデータベースであり、MRM 測定で475成分、Scan 測定で568成分が登録されている。Smart Metabolites Database には、最適化された分析メソッドが用意されており、手間のかかるメソッド開発を必要としない。メソッドには、分析カラムの指定やサンプルの前処理方法、誘導体化の方法等が示されているので、分析の専門ではない人でも、データベースに登録されている475成分を比較的簡単に MRM 測定することができる。

Smart Metabolites Database を使って、ヨーグルト中のメタボライトについて測定を行った。国産ヨーグルト3種についてメソッドに従い誘導体化処理し、島津製作所製 GC-MS/MS (GCMS-TQ8040) を用いて測定した結果、3種のヨーグルトに共通する成分として、表4に示す200弱の成分を検出することが出来た。

4.2.2 たんぱく質由来ペプチドの網羅分析

たんぱく質を LC-MS で直接測定するには分子量が大きく不向きであるので、ショットガンプロテオミクスのように、前処理でペプチドに切断してから測定するのが主流である。発酵食品のように既にた

表4 ヨーグルトから検出されたメタボライト

成分群	検出成分数
有機酸類	54
アミノ酸類とその代謝物	27
糖類とその代謝物	65
脂質とその代謝物	10
その他	36

(島津製作所より情報提供)

たんぱく質が切断されている場合、既知のたんぱく質由来のペプチドであれば、精密質量 MS/MS が測定できる LC-QTOF を用いて測定し、そのデータをフリーのデータベースである MASCOT サーバーに充ててフラグメント解析を行えば、難しい解析を伴わず、簡単にペプチドのアミノ酸配列が推定できる。例えば、乳製品に含まれるたんぱく質のほとんどが、アミノ酸配列既知のカゼインたんぱく質とホエイたんぱく質であるため、ここから発酵などで切断され生成したペプチドは、LC-QTOFでの測定と MASCOT での検索により比較的容易に配列を把握できる。

(1) LC-QTOF を用いたチーズ中のペプチド分析

8種のチーズ（国産3種，デンマーク産2種，フランス産3種）について，Waters製 LC-QTOF (Xevo G2-XS QToF) を用いてペプチドを測定し，Waters製の解析ソフトウェア UNIFI，データベース MASCOT を用いて，各々のアミノ酸配列の解析を行った。いずれのチーズからも非常に多数のペ

プチドが検出され，アミノ酸配列が推測できた。カゼインたんぱく質由来のペプチドは，いずれのチーズもカゼイン (α_{S1} , α_{S2} , β , κ) のペプチド配列の70~100%相当をカバーした (図8)。

4.3 網羅分析の活用

これまで紹介した例は，いずれも現時点では「測定できた」というレベルまでであり，このように網羅的に測定された膨大な成分情報を，どのように解析してどのような情報を得るかが，これからの重要な研究課題となる。例えば，品質管理に活用するのであれば，時系列，工程別，条件別等の様々なサンプルを測定し，重要な成分がそれぞれでどのように変動しているかを解析することで，着目すべき品質管理上のパラメータが把握できる。機能性評価に活用するのであれば，生成している代謝物やペプチド等の変動を把握し解析することで，乳製品の新たな代謝経路の解明や機能性成分の探索など等に応用されることが期待される。

5. おわりに

今回紹介したクロマトグラフィー質量分析法の技術は，いずれも画期的で素晴らしい技術で目的に応じて適宜活用や応用できれば，かなり有用な成分情報が得られるはずである。

乳製品に限らず食品の成分面での解明は始まったばかりで，その生成メカニズムや機能の詳細は，まだほとんどわかっていない状況であるが，今後，そ



図8 カバレッジマップ

α -S1-カゼインのアミノ酸配列のうち，白抜き部分の TGSESTE と SISSE の配列を含むペプチドは検出されていないが，検出されたペプチドにより，93%に相当する配列がカバーされた (日本ウォーターズより提供)

これらの理解は飛躍的に進むと予想される。その推進力となるのは、間違いなくクロマトグラフィー質量分析法であり、これまで把握できなかった成分の情報が、比較的容易に一気に把握出来るようになった。今後、乳製品や食品の機能解明をさらに深く進めていくには、得られた成分の情報と本質的な機能情報とを的確に関連付けることができる解析技術の進展に委ねられている。

謝辞

本稿執筆にあたり、貴重な情報並びにデータを提供して頂きました、アジレント・テクノロジー株式会社、株式会社エービー・サイエックス、株式会社島津製作所、日本ウォーターズ株式会社、LECOジャパン合同会社（50音順）の各社に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 日本質量分析学会：第38回質量分析講習会テキスト（2015）
- 2) 日本質量分析学会：第38回質量分析講習会スライド資料（2015）
- 3) National Institute of Standards and Technology (NIST):
<https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=start> (2018)
- 4) Wiley: <https://www.wiley.com/en-us/Wiley+Registry+of+Mass+Spectral+Data%2C+11th+Edition-p-9781119171010> (2018)
- 5) METLIN:
https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage (2018)
- 6) Matrixscience:
http://www.matrixscience.com/search_form_select.html (2018)
- 7) European MassBank: <https://massbank.eu/MassBank/Index> (2018)
- 8) 斎藤瑞恵, 小堤大介, 川崎道子, 神橋美保, 中村溜花, 佐藤吉朗, 遠藤光春：食品衛生学雑誌 49(3) 228-238 (2008)
- 9) M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbacher, F. J. Schenck: J. AOAC Int. 86(2) 412-431 (2003)
- 10) 厚生労働省：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法，
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/zanryu/zanryu3/siken.html (2018)
- 11) アジレント・テクノロジー株式会社：
<https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/GC-MS-201512OS-001.pdf> (2018)
https://www.chem-agilent.com/pdf/low_5994-0080JAJ.pdf (2018)
- 12) 株式会社アイスティサイエンス：STQ 法ガイドブック20160112改訂版，
<http://www.aisti.co.jp/> (2018)
- 13) 中津海洋一，松本雅記，中山敬一：生化学 84(1) 53-57 (2012)