

ビッグデータ化モレキュラー質量分析による加工食品の 未知食中毒原因の検知法の開発

立命館大学 薬学部

井之上 浩一

加工食品は常に安定かつ、持続的生産及び販売がなければならない。しかし、近年のニュースでは、加工食品の汚染や劣化による事例が後を絶たない。現在、素材・調理などが複雑な加工食品において、予期せぬ汚染や劣化の検査には、フードディフェンス（食品防御）の新たな概念が求められている。そのため、従来のターゲット分析に加え、複雑な未知成分を踏まえた測定技術とデータ処理の構築が今後のフードディフェンスでは必須と考えられる。食品の網羅的解析は、ビッグデータに基づく、フードミクスという概念が生まれている¹⁻³⁾。そのなかでも、食品（野菜）中の農薬類に関するスクリーニングへ応用した例⁴⁾があり、今後、加工食品を含めて網羅的な解析が達成できると考えられる。従来までの加工食品に関する汚染などのモニタリング対象は、ダイオキシンなどの塩素系化合物、細菌及びマイコトキシン類であった。しかしながら、2008年に生じたメラミン混入粉ミルクでは、予想不可能な食品汚染（混入事例）が世界中を震撼させ、中国で5万人以上の乳幼児（3才以下）の被害が生じた。現在、私たちの食生活分野では、多彩化された乳製品と裏腹に全く想定外の汚染などが発生することがあり、既存の技術や概念では到底解析できないレベルに達している。そこで、予想不可能な乳製品の劣化や汚染状況の情報に対して、新たなオミクス解析（ノンターゲット分析）を考案する。本研究目的を達成するためには、非選択的理化学分析技術を用いて、食材の膨大かつ複雑なモレキュラーデータを取得し、詳細な解析のための統計手法を統合的にシステム化することが第一段階である。このシステムは、乳製品の種別判断、特徴別精査などへ応用可能と判断しており、十分に利用できる。

実験方法

1. 前処理

各粉ミルクを電子天秤にて1.0 g量り、本試料をプラスチック製チューブに移して、メスピペットで精製水 10 mLを取り、それに加えた。その後、本試液を限外ろ過(14,000 g, 10 min, 4℃)にて処理した。得られた採取液 200 µL とアセトニトリル 200 µL を混和し、フィルターろ過を行い、測定試料とした。

2. 測定条件

粉ミルクの成分をより網羅的に解析を行う為に、より多くの情報を得ることのできる分析方法の検討が必要であ

る。また、膨大なデータの処理を行うことになるため、目的に応じた処理が必要になる。そこで本章では、粉ミルクの分離条件およびLC-MS測定条件を検討した。粉ミルクは多く成分を含むため、化合物の分離分析には逆相系カラムおよびHILICモードの両モードでの検討を行った。また、解析では分離したすべての検出ピークを拾えるように設定した。そして、確立した手法を用いて、PCAにより種類別に評価できるか検討を行った。以下のその条件を示す。

装置

UPLC : Waters ACQUITY™ Ultra Performance LC

TOF-MS : Waters LCT Premier™ XE
解析ソフト : MarkerLynx XS, SIMCA

LC 条件

Column TSKgel ODS-100Z (2.0 × 150 mm, 3 µm) (東ソー株式会社) 逆相系カラム

TSKgel Amide-80 (2.0 × 150 mm, 2 µm) (東ソー株式会社) HILIC モード

Column Temperature : 40℃

Flow Rate : 0.2 mL/min

Mobile Phase : A: 0.1% ギ酸水溶液, B: 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

Injection volume : 10 µL

Gradient TSKgel ODS-100Z: B=2-2-98-98-2-2% (0-5-30-40-40.1-50 min)
TSKgel Amide-80: B=95-95-10-10-95-95% (0-5-30-40-40.1-50 min)

MS 条件

Ion mode : Electrospray positive

Analyzer : W mode

Capillary voltage : 10 V

Desolvation temperature : 350℃

Source temperature : 120℃

Cone gas flow : 50 L/hr

Desolvation gas flow : 650 L/hr

MS Range : m/z 100-1000

解析条件

Mass tolerance : 0.1 Da

Apex track peak parameters
: Peak width at 5% height
(seconds) = 10 / Peak-to-peak
baseline noise=50

Apply smoothing : Yes.

Collection Parameters : Intensity threshold (counts)
= 100 / Mass window = 0.05 /
Retention time window = 0.3

Noise elimination level : 10

Deisotope data : Yes.

Maximum elemental composition
: C=500, H=1000, N=200,
O=200, S=10, P=10, and Cl=10
(mass tolerance: 5.0 mDa)

結果および考察

1. 分析条件の検討

粉ミルクは多くの成分（添加物、乳成分、脂質など）を含有しており、その成分分離分析を行うため、逆相系カラムおよびHILICモードを検討した（図1）。本実験は移動相に0.1%ギ酸水溶液および0.1%ギ酸アセトニトリル溶液を用い、検出にはエレクトロスプレーイオン化ポジティブ（ESI-ポジティブ）モードを利用した。ESI-ポジティブモー

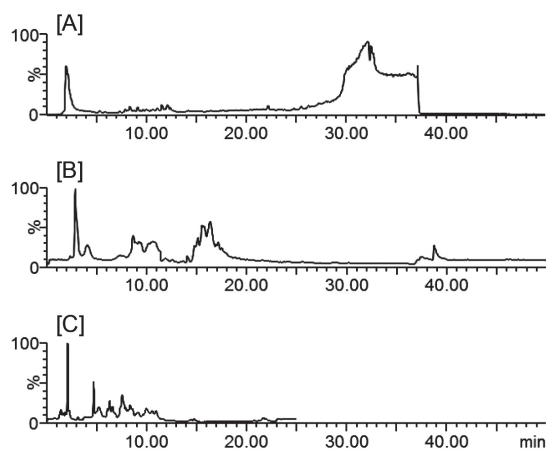


図1 LC-MS クロマトグラムと検出ピークの検討

[A] Column: Acquity UPLC BEH C18 column (1.7 μ m, 2.1 $\times$ 100 mm) ; Gradient mode: Type A; Flow rate: 0.2 mL/min; Detected numbers: about 800

[B] Column: TSKgel Amide-80 column (3 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm) ; Gradient mode: Type B; Flow rate: 0.2 mL/min; Detected numbers: about 1,200

[C] Column: Trial TSKgel Amide-80 column (3 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm) ; Gradient mode: Type C; Flow rate: 0.4 mL/min; Detected numbers: about 1,200

ド (m/z 100-1000) で測定を行い、保持時間として0.5分から40分で検出化合物数を得た。表1に検出化合物数を示した。逆相系カラムで約1040化合物、HILICモードで約1300化合物が検出された。そして、両モードでの測定を合算させることで、約2230化合物を得ることが出来た。よって、本手法にはより多くの成分を検出するために、逆相モードとHILICモードを合算させる手法を採用することとした。

表1 LC-MSによって検出されたピーク検出数

		HILIC (amide 80)			ODS (ODS-100Z)			合計
	N	検出数	平均	SD	検出数	平均	SD	平均 検出数
Sample 1	1	1333			1140			
	2	1399			1139			
	3	1397	1333.8	90.5	1146	1144.5	6.5	2478.3
	4	1206			1153			
Sample 2	1	1398			598			
	2	1496			584			
	3	1390	1371.0	123.8	569	581.5	12.6	1952.5
	4	1200			575			
Sample 3	1	1153			1104			
	2	1247			1112			
	3	1140	1142.8	88.4	1131	1116.8	11.5	2259.6
	4	1031			1120			

2. 加工食品の汚染モニタリング

粉ミルクにメラミンが人為的に添加された場合、判断可能であるか検討を行った。LC-MSにて、2種の粉ミルク試料（標準試料、100 ppmメラミン混入試料）計4サンプルをHILICモードおよび逆相系カラムの分離モードで行った。それぞれのメラミン混入試料において未知物質として混入したメラミンのピーク (m/z 127.03) を抽出し、HILICモードおよび逆相系カラムの両分離モードで未知物質と設定した汚染の原因であるメラミンを検出することができた（図2）。測定し得られたデータにおいて、統計的な解析であるPCAを行った（図2）。赤色及び緑のプロットがそれぞれの標準試料として、青及び黄色が未知汚染物質（メラミン混入）である。PCAにおいて粉ミルクの種類だけでなく基準試料と汚染試料が明らかに判別可能で

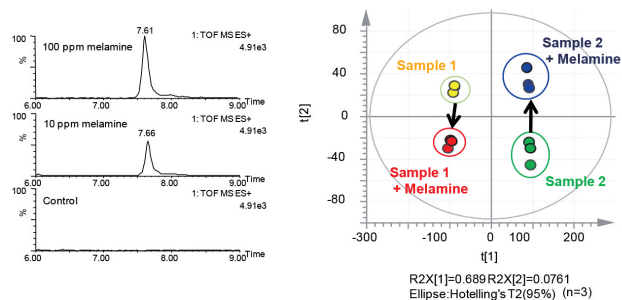


図2 LC-MSによる粉ミルク中のメラミン汚染の評価

あった。

粉ミルクに農薬類が人為的に添加された場合、本手法が有用であるか検討を行った。添加した農薬はエトフェンプロックス、アセタミプリド、メタミドホス、マラチオンの4種である。LC-MSにて、粉ミルク試料（標準試料、10 ppm 農薬混入試料）をHILICモードおよび逆相系カラムの両分離モードで分析した。それぞれの未知物質（農薬）混入試料において未知物質として混入した各農薬のピークを抽出し検出を確認した。分析したデータにおいて、統計的な解析であるPCAを行った（図3）。青色のプロットが標準試料、赤色のプロットがエトフェンプロックス、水色のプロットがメタミドホス、緑のプロットがアセタミプリド、黄色のプロットがマラチオンの混入試料として示している。PCAにおいて基準試料と各農薬の汚染試料が明らかに判別可能であった。

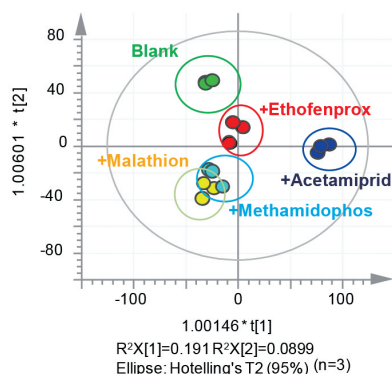


図3 LC-MSによる粉ミルク中の農薬汚染の評価

粉ミルクに重金属類が人為的に添加された場合、本手法が有用であるか検討を行った。添加した重金属は鉛、カドミウム、水銀、ヒ素の4種である。LC-MSにて、粉ミルク試料（標準試料、10、100 ppm 重金属混入試料）をHILICモードおよび逆相系カラムの両分離モードで分析した。それぞれの未知物質（金属）混入試料において未知物質として混入した各金属類のピークを抽出し検出することはできなかった。分析したデータにおいて、統計的な解析であるPCAを行った（図4）。黒色のプロットが標準試料、赤色のプロットがカドミウム、水色のプロットが水銀、緑のプロットが鉛、黄色のプロットがヒ素の混入試料として示している。PCAにおいて基準試料と金属類の汚染試料が明らかに判別可能であった。しかしながら、ヒ素に関しては判別化できなかった。これらの結果より、含有金属が内在する有機物に影響を与え、イオン化のパターンが変化したものと考えられる。いずれも、ビッグデータによる判断で、金属類の汚染も評価可能であることが分かった。

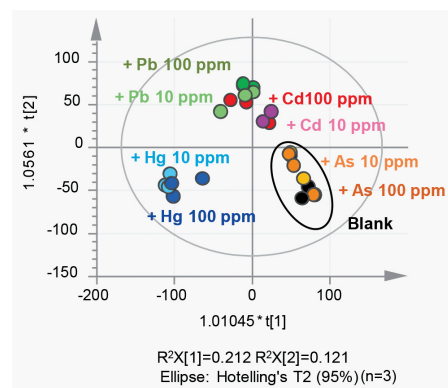


図4 LC-MSによる粉ミルク中の金属類汚染の評価

最後に粉ミルクに劣化指標へ応用できるか検討してみた。賞味期限内と期限切れの判別と、保存状態による有機物変動を識別へ本手法が応用できるかを行った。LC-MSにて、粉ミルク試料（賞味期限内と期限切れ）をHILICモードおよび逆相系カラムの両分離モードで分析した。また、保存状態での変化として、用事調整と各保存温度の違い（-80、10、38℃）で行った（図5）。いずれも、判別が可能であり、本手法の有用性を示すことが達成できた。

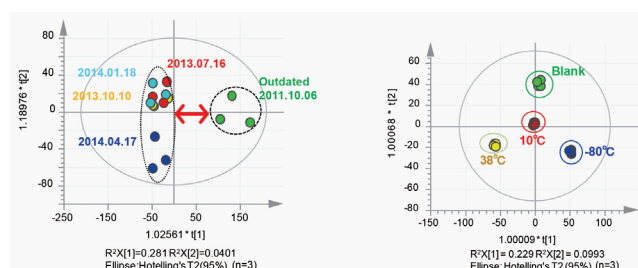


図5 LC-MSによる粉ミルク中の劣化指標の評価

まとめ

本研究では、加工食品のフードディフェンスを目指したビッグデータ化モレキュラー解析の構築を目指した。加工食品の製品には、代表的な粉ミルクを採用し、理化学的分析技術には、LC-MSを用いた。本実験から、LC-MSでは、数ppmレベルにおいても検出することが可能であり、問題と考えていた極性に関する測定範囲も2つの分離モードを利用することで達成できた。そのため、メラミンや農薬類、重金属、劣化のように外部から意図的に混入される恐れを未然に検知できた。今後は、さらに微生物などの想定外の汚染評価へ応用することを検討する必要がある。

参考文献

- 1) Cifuentes, A. Food analysis and foodomics. J. Chromatogr. A 1216, 7109. (2009)
- 2) Herrero, M., García-Cañas, V., Simo, C., Cifuentes, A. Recent advances in the application of capillary

- electromigration methods for food analysis and Foodomics. *Electrophoresis* 31(1), 205-228. (2010)
- 3) Herrero, M., Simó, C., García-Cañas, V., Ibáñez, E., Cifuentes, A. Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. *Mass Spectrom. Rev.* 31(1), 49-69. (2012)
- 4) Inoue, K., Tanada, C., Sakamoto, T., Tsutsui, H., Akiba, T., Min, J.Z., Todoroki, K., Yamano, Y., Toyo'oka, T. Metabolomics approach of infant formula for the evaluation of contamination and degradation using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Food Chem.* 181, 318-324. (2015)