

親水性相互作用クロマトグラフィーを用いた LC/MS による食品中の高極性成分の分析

Analysis of polar compounds in food samples with LC/MS conjugated with HILIC

尾形 三恵子

Mieko OGATA

メルク株式会社 メルクミリポア事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

Tel: 03-5434-5918

E-mail: mieko.ogata@merckgroup.com

【はじめに】

高速液体クロマトグラフィーはここ数 10 年で発展を遂げ、最も広く用いられている分析手法の一つであり、近年では検出に質量分析計が汎用されている。主に用いられている逆相モードは幅広いアプリケーションに対応可能であり、応用範囲の広い優れた分離技術である。しかし、逆相モードでは高極性化合物を十分に保持することができず、高極性化合物の簡便、高感度な分離手法が求められている。

食品分野では、最も頻繁に用いられる手法の一つにケルダール法による全窒素分測定が挙げられるが、特異性のない手法であるがために、タンパク含有量を高く偽るために窒素系化合物が混入されるという事件が発生した。こうした汚染物質を含め、人工甘味料、ビタミン、農薬や動物用医薬品など、食品の安全の観点より、高極性化合物を分析するニーズは高まっている。

逆相カラムでこれらを分離する場合は、誘導体化や複雑なサンプル前処理が必要となる。一方、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC, Hydrophilic interaction liquid chromatography) は高極性化合物に適した分離モードであり、複雑なサンプル前処理をすることなく分離が可能であるため、近年注目が集まっている。また、有機溶媒比率の高い移動相が使用できることから、エレクトロスプレーイオン化質量分析の感度を向上できる事もメリットの一つであり、MS の有効な分離手法として期待できる。

本発表では、HILIC の分離メカニズムについての考察および、HILIC/LC/MS を用いた最新の食品中高極性成分の分析事例を報告する。

【親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)】

“HILIC” は、1990 年に Albert によって「水系有機溶媒と高極性固定相の組み合わせによる分離モード」と定義され、逆相モードとは異なる以下の特徴を持つ。

- ①極性の高い固定相を用いる (図 1)
- ②溶出順序が逆相カラムとは逆になる (高極性化合物ほど保持が強くなる) (図 2)
- ③静電的相互作用、親水性分配など様々な相互作用が関与している

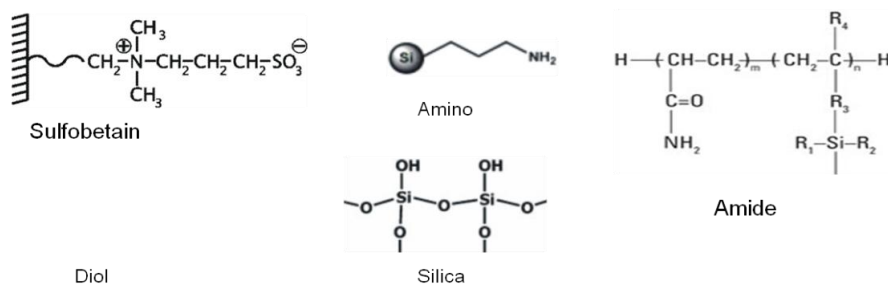


図1 HILIC型固定相の種類

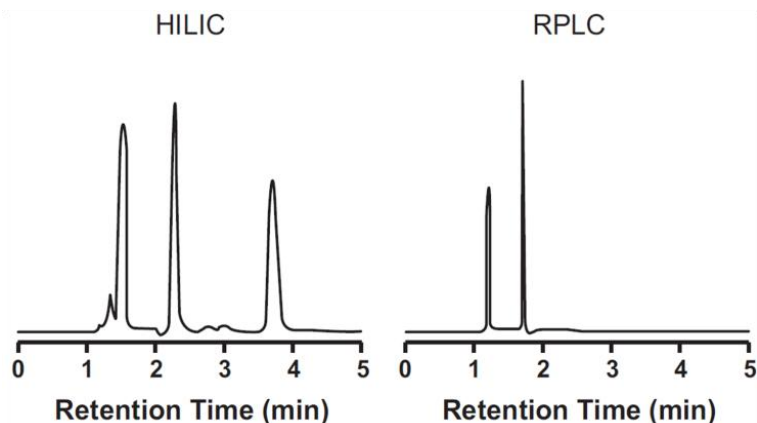


図2 HILIC と逆相モードによるペプチドの分離

Mobile phase: (HILIC) 60:40 = acetonitrile/10 mM ammonium acetate (pH 7), (RPLC) 5:95 = Acetonitrile/10 mM ammonium acetate (pH 7).

Sample: (1) Phe-Gly-Gly-Phe, (2) Leu-Gly-Gly, (3) Gly-Gly-Gly.

【HILIC に用いられる典型的な移動相】

HILIC の典型的な移動相には、40-97%のアセトニトリルを含む水（揮発性緩衝液）が用いられるため、MS 検出器に適合性がよく、LC/MS の有効な分離手法の一つであると言える。LC/MS において、分離手法を逆相から HILIC に変更することで感度が 10 倍向上したという事例も報告されている（図 3）。

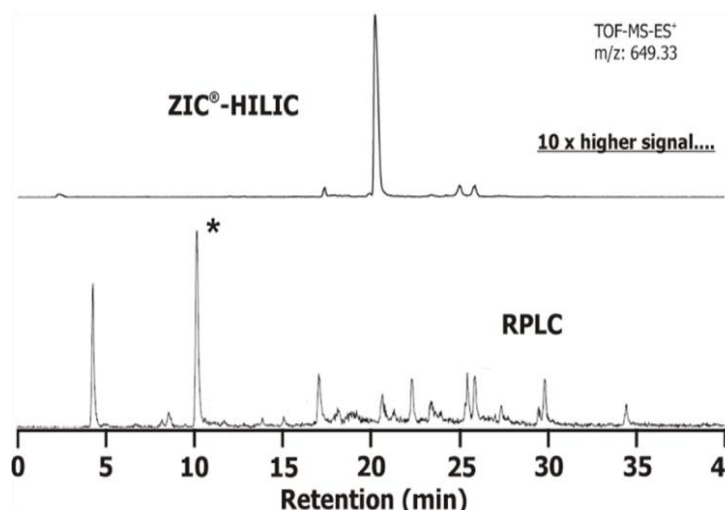


図 3 BSA 酵素消化産物の分析

Column : ZIC®-HILIC, PEEK 150 x 0.3 mm, 5 μ m, 200 Å 150481

Mobile Phase : A: 100% Milli-Q water with a 0.25% formic acid (FA) B: 100% Acetonitrile with 0.25% formic acid (FA), Gradient : Initial composition: 90% B and 10% A. Linear gradient from 0-40 min with 1.5 % increase of A/min.

Flow rate : 5 μ L/min, Detection : MicroMass Ultima-QTOF, Needle voltage: 3.1 kV, Cone voltage: 45V collision energy: 10V; Scan range: m/z 400-1800; 1.5 s cycle time, Temperature : Ambient, Inject.

volume : 1 mL of 10 pmole digested sample injected in mobile phase, Sample : Trypsin digested BSA

【HILIC 固定相の保持機構】

各メーカーより修飾基の異なる HILIC カラムが多数市販されており、それぞれ分離挙動が異なることから、分離メカニズムの考察⁽¹⁾や、カラムの分類・性能評価に関する研究も盛んに行われている⁽²⁾。HILIC モードでは、逆相モードと比較して強い相互作用が働いていると考察されることもあるが（図 4）、高い分離度を得るためには、弱い相互作用による保持が有利である。修飾基の種類によって、+もしくは-の電荷を有する電荷型、電荷を持たない非電荷型、両方の電荷を有する両性イオン型の 4 種類に分類することができる。MerckSeQuant 社製 ZIC®-HILIC は、両性イオン官能基（スルフォベタイン基）を修飾してあり、主に充填剤表面に水和層が形成されることによる親水性分配が働いていると考察されている（図 5）。スルフォベタイン基は強アニオン・強カチオンの組み合わせであるため、pH による影響が小さく、常に安定して強い保持が得られ、陽イオン、陰イオンなど幅広い高極性化合物の分離が可能であるという特徴がある。

静電相互作用	脂溶性 極性	相対的な強度 [kJ/mol]
水素結合を含む		40
水素結合を含まない		20
イオンー双極子相互作用		4~17
水素結合		4~17
Van der Waals力		
永久双極子ー永久双極子		4~17
永久双極子ー誘起双極子		2~4
誘起双極子ー瞬間双極子		2~4
芳香環の電荷移動		4~17
疎水性相互作用	疎水性	4

図4 分子識別が起こる相互作用の強弱
(真空中)

(メルクミリポアクロマトグラフィーセミナー資料より抜粋)

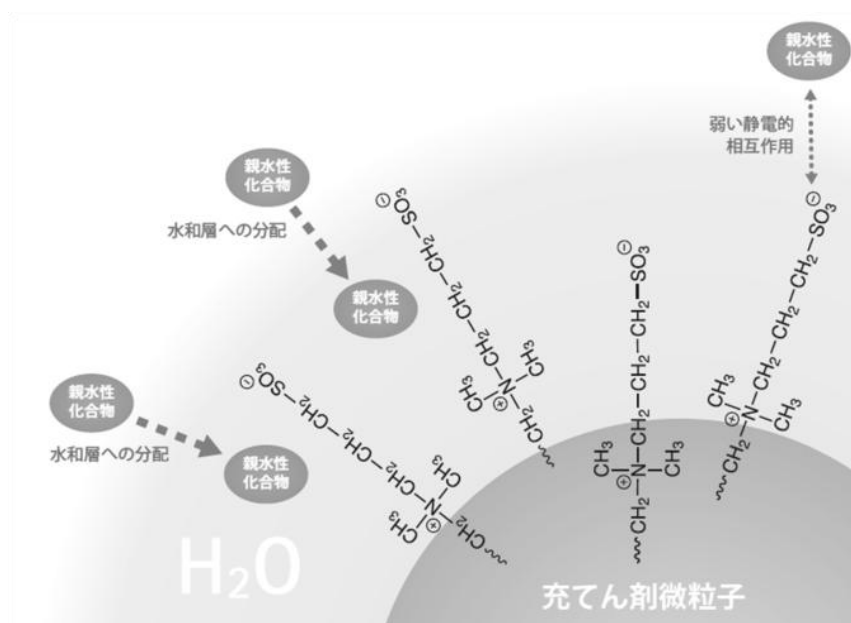


図5 ZICTM-HILIC の親水性分配による保持機構

【LC/MS の分離手法としての HILIC】

逆相カラムを用いた LC/MS で高極性化合物を分析検討する場合、保持を得るための解決策として以下の 3 点が挙げられる。

- ①移動相の水の割合を高める
- ②イオンペア試薬を用いる
- ③誘導体化を行う

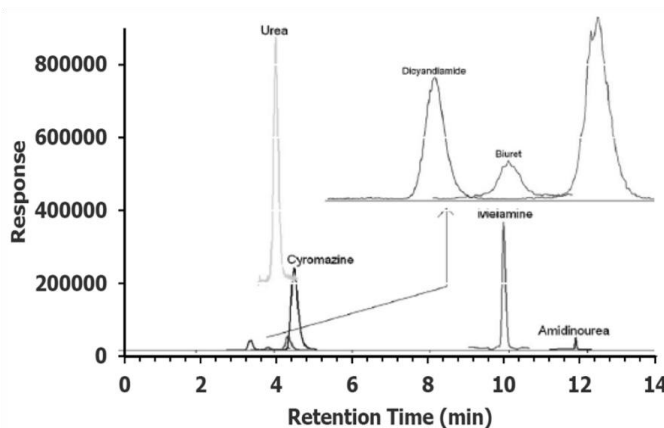
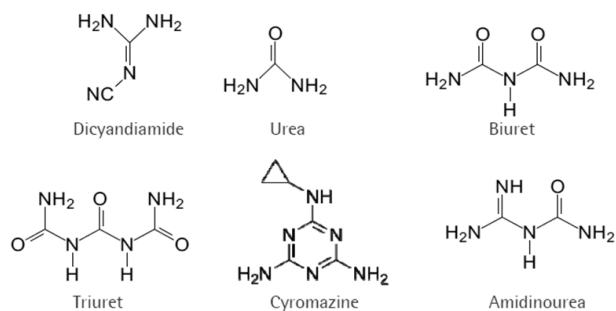
しかし、①では溶媒の揮発性が悪い、②は不揮発性の塩を添加することになるためこれらは MS との相性としては良くない。③の手法も再現性、迅速性の面で問題がある。

HILIC モードを用いることで、これらの課題を解決し高感度な分析を行うことができるため、高極性化合物を分析する際の LC/MS の分離手法として期待できる。以下に、食品中の高極性化合

物の分析事例を紹介する。

【食品中の窒素化合物の分析】

2008年に起こった粉ミルクへのメラミン混入事件に引き続き、現在もなお窒素化合物による汚染のリスクをぬぐうことはできず、FDAではタンパク質添加物として混入され得る化合物を6種類リストに挙げている（図6）。これらの化合物に対して、ZIC®-HILICによる高感度分析が可能である。



【農薬成分の分析】 EUでは現在、507種もの農薬の使用に制限を設けており、その多くは古典

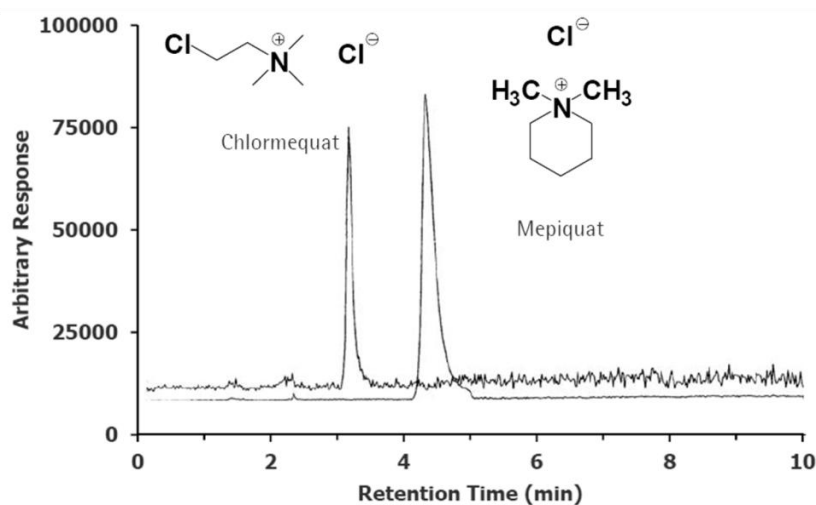


図7 ChlormequatとMepiquat検出
Column: SeQuant® ZIC®-HILIC (3.5 μ m, 200Å) 100x2.1 mm
Injection: 20 μ L
Detection: Electrospray-MS in positive mode (ESI+). Single ion monitoring (SIM) at m/z 114 and 122
Flow Rate: 0.2 mL/min.
Mobile Phase (v/v): Acetonitrile and 25 mM ammonium acetate (80:20)
Temperature: Ambient
Diluent: Mobile phase
Sample: Standard injection of chlormequat and mepiquat

Prominence UFLC XR with AB Sciex 4000 QTRAP in ESI(+) mode [M+H]⁺ m/z 85.0 for DC, 61.0 for urea, 104.1 for BU, 147.1 for TU, 167.1 for CY, 127.1 for melamine (MEL) and 103.0 for AU were the precursor ions for MS/MS;
(Journal of Chromatography A 1220 (2012) 101–107)

的な手法による分析が困難である。ChlormequatとMepiquatは、極性が非常に高いため通常の逆相カラムによる分析は困難であり、ZIC®-HILICを用いることでLC/MSによる高感度分析が可能であった（図7）。また、構造が複雑で非常に分析の困難な農薬成分Glyphosateについても、HILICカラムを用いた検討が進められている。

【Aminoglycosides（抗生物質）の分析】

アミノグリコシドはアミノ基を有する糖であり、微生物による汚染を防ぐ目的で医薬品、動物用医薬品として広く使用されているが、聴器毒性や腎毒性を示す。抗生物質の過度の使用と動物性食品が主な摂取源であり、食品中のアミノグリコシドを定量する必要がある。Streptomycin、Gentamycine、Neomycin の ZIC®-HILIC による分析検討を行った (図 8)。

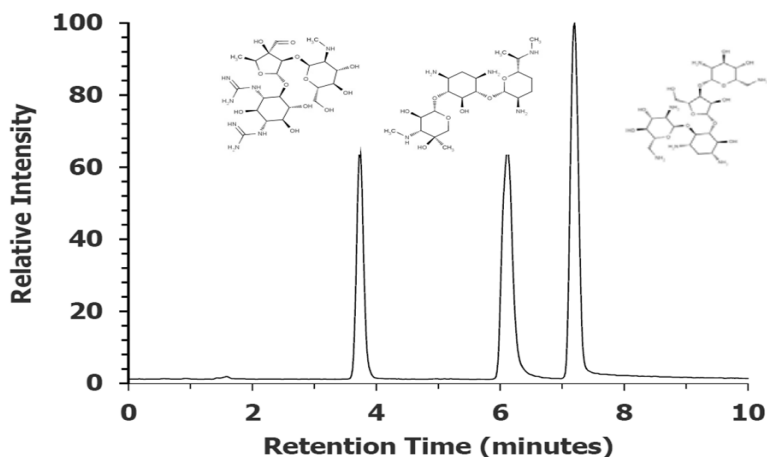


図 8 抗生物質の検出

Column: SeQuant® ZIC®-HILIC (3.5 μ m, 100Å) 100x2.1 mm, Injection: 5 μ L, Detection: Shimadzu LCMS-2010EV; ESI in positive mode; Heat block and CDL temperature 250 °C; Spray gas: nitrogen at 1.5 L/min; Detector voltage: 2 kV. SIM in positive mode: m/z 582 (Streptomycin), 464 (Gentamycin), and 615 (Neomycin)

Mobile Phase (v/v): A: Acetonitrile and formic acid (99:1), B: Ammonium acetate (100 mM) and 3% formic acid (100%) Flow Rate: 0.4 mL/min, Temperature: 50 °C, Diluent (v/v): Acetonitrile/Milli-Q® water (30:70)

Sample: 5 μ g/mL STR, 25 μ g/mL GEN and NEO in diluent

【牛乳中の糖類の分析】

糖類の分析にはアミノプロピルカラムが広く用いられているが、カラムの耐久性に問題点があった。ポリマー基材の充填剤を用いた ZIC®-pHILIC は、アルカリ性条件下で使用でき (pH2~11)、化学的安定性に優れているため、ESI-MS によるアルカリ条件下での糖類の定量が可能である。牛乳中のラクトースの分析検討を行った。除タンパク処理をしたサンプルは多量の有機溶媒を含むが、HILIC モードでは有機溶媒が弱溶媒となるため、水で希釈することなくカラムに注入できる。簡便な前処理と HILIC/LC/MS の組み合わせにより、牛乳中の糖を高感度に分析できることが示された (図 9)。

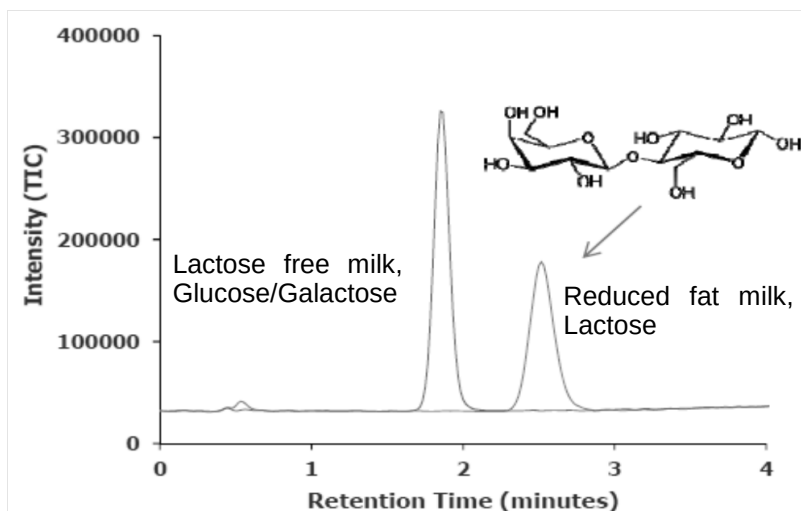


図9 牛乳中のラクトースの分析

Column: ZIC®-pHILIC (5 μ m, polymer) 100x2.1 mm
Injection: 2 μ L
Detection: ESI MS SIM, negative mode
Flow Rate: 0.35 mL/min.
Mobile Phase (v/v): Acetonitrile and 1% Ammonia Gradient 73:27 to 60:40 in 0 to 3 min.
Temperature: 55 °C
Sample: Milk samples were diluted in water 5 times. Precipitation in 4 parts basic acetonitrile (1% ammonium hydroxide).
Centrifugation: 6400rpm 5 min.
Filtration: 0.45mm PTFE syringe filter. Dilution 100x.

【まとめ】

食品中に含まれる高極性化合物を、両性イオン官能基型 **HILIC** カラムを用いた **LC/MS** により高感度に検出できることが示された。**HILIC** モードでは、有機溶媒比率の高い移動相を使用可能であることから **MS** の感度向上も可能であり、高極性化合物の **LC/MS** による分析に最適な分離技術であると考えられる。

現在は、装置の飛躍的な進歩により高感度分析が容易に可能になっている。しかしながら、得られるデータが分析結果として妥当であるかどうかは、検出器に導入されるサンプルの状態によるところが大きい。特に、マトリックス成分が多種多様である食品サンプルの場合、クロマトグラフィーによる分離が結果に大きく影響を及ぼすと考えられ、分析種に合った分離手法の選択が重要である。

また、未知の汚染物質の分析を行う場合など、逆相モードのみで得られた情報は網羅的であるとは言えず、**HILIC** モードとの組み合わせによって初めて、網羅的な情報を得ることができると考えられる。今後、**LC/MS** の分離手法として **HILIC** カラムが積極的に用いられ、より迅速で信頼できる分析手法の確立に一役を担っていくことを期待する。

【参考文献】

- (1) Journal of Chromatography A, 1218, (2011), 6630-6638, E. Wikberg et. al
- (2) Journal of Chromatography A, 1218, (2011), 5903-5919, Y. Kawachi et. al