願う安心、創る技術
SAIKA

# LC-MS/MSを用いた食物アレルゲン一斉分析法の開発

SCIEX

○稲垣　江梨[1)]、山下　賀容子[1)]、建田　潮[2)]
1)一般財団法人　雑賀技術研究所、2)SCIEX

## 緒言

食物アレルゲン分析法については、消費者庁により、定量検査法としてELISA法が、定性検査法としてPCR法やウエスタンブロット法が指定されている。しかし、ELISA法は、偽陽性や偽陰性の結果を生じる可能性があること、市販キットの対象が特定原材料とその他の数品目のみであること、また1回の検査で1品目のアレルゲンに限られることから、食品中に含まれる複数のアレルゲンを迅速かつ正確に検査する方法の確立が望まれている。**LC-MS/MSによるアレルゲン分析**は、SCIEXが提案し、AOAC OMAを取得するなど注目されており、従来の分析方法に比べて、選択性が高く、高感度、迅速であるなどの利点がある。今回、**LC-MS/MSを用いた加工食品中の食物アレルゲン一斉分析法**を検討し、その結果を報告する。

## 方法

### 1.標準液調製方法

標準用試料（市販の牛乳、卵、小麦、落花生、そば、えび、大豆）から、消費者庁通知法を参考に調製した。すなわち、卵の場合、新鮮卵1kgの卵殻を外し、均一にホモジナイズした後に凍結乾燥し、微粉砕したものを標準用試料とした。タンパク質の抽出には**相間移動溶解剤＊（Phase Transfer Surfactant, PTS）**を用い、BCA法にて濃度を定量し、標準液とした。

### 2.試料調製方法

試料（市販シチュールウ：特定原材料不使用製品を含む）中のタンパク質をPTSにより抽出し、還元アルキル化の後、トリプシンを用いて消化し、固相カラムにてペプチドを精製した。添加試料は、抽出前に試料あたり10mg/kgになるよう、全ての標準液を加えて同様の処理を行った。

#### 1.標準液調製方法

標準用試料（市販の牛乳等）
↓
PTS溶液　・10mM SDC（デオキシコール酸ナトリウム）
・12mM SLC（N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム）
・Tris水溶液
↓
加熱、超音波抽出
↓
アセトン沈殿
↓
限外濾過
↓
BCA法にて濃度決定
標準液として使用

図1：完成した標準液

＊PTSの特徴：酸性条件下で疎水性度が上昇することにより、酢酸エチルを用いた液液分配でPTSを除去できる。PTSには、タンパク質可溶化能の高い界面活性剤を用いる。

#### 2.試料調製方法

試料（市販シチュールウ）
├ 標準液添加（試料あたり10mg/kg）
↓
PTS溶液
↓
加熱、超音波抽出
├ DTT
├ IAA
├ トリプシン
↓
タンパク質の消化
一晩静置
├ 酢酸エチル、TFA
↓
PTSの除去
↓
固相カラムで精製
↓
LC-MS/MS

図2：シチュールウ

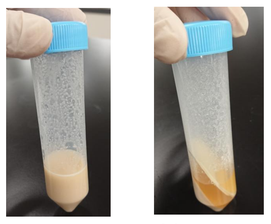
図3：PTS抽出（遠心分離の前（左）後（右））

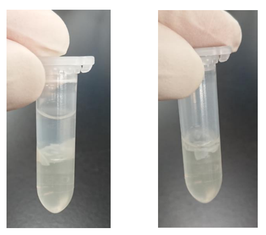
図4：PTS除去（酢酸エチル層を除去する前（左）後（右））

### 3.機器分析条件

HPLC：LC-30AD（島津製作所社製）
質量分析計：QTRAP5500
（SCIEX社製）

図5：測定機器

アプリケーション：vMethod Application for Multiple Allergen Screening in Food Matrices using LC-MS/MS；vMethod Application for Gluten Quantitation in Food Matrices using LC-MS/MS(SCIEX社製)
移動相：0.1%ギ酸水、0.1%ギ酸アセトニトリル
分析カラム：InertSustain AQ-C18 1.9μm、2.1×100mm（GL Sciences社製）
分析モード：ESI・ポジティブ、注入量：5μL

## 結果

### 4.シチューの検討結果

作製した標準液を用いて、シチューの食物アレルゲン一斉分析を実施したところ、特定原材料不使用製品から、ピークは同定されなかった。乳・小麦・大豆を含む製品からは、対象ピークが同定された。同様に、添加試料において、対象アレルゲン全てが同定できた。（図6）

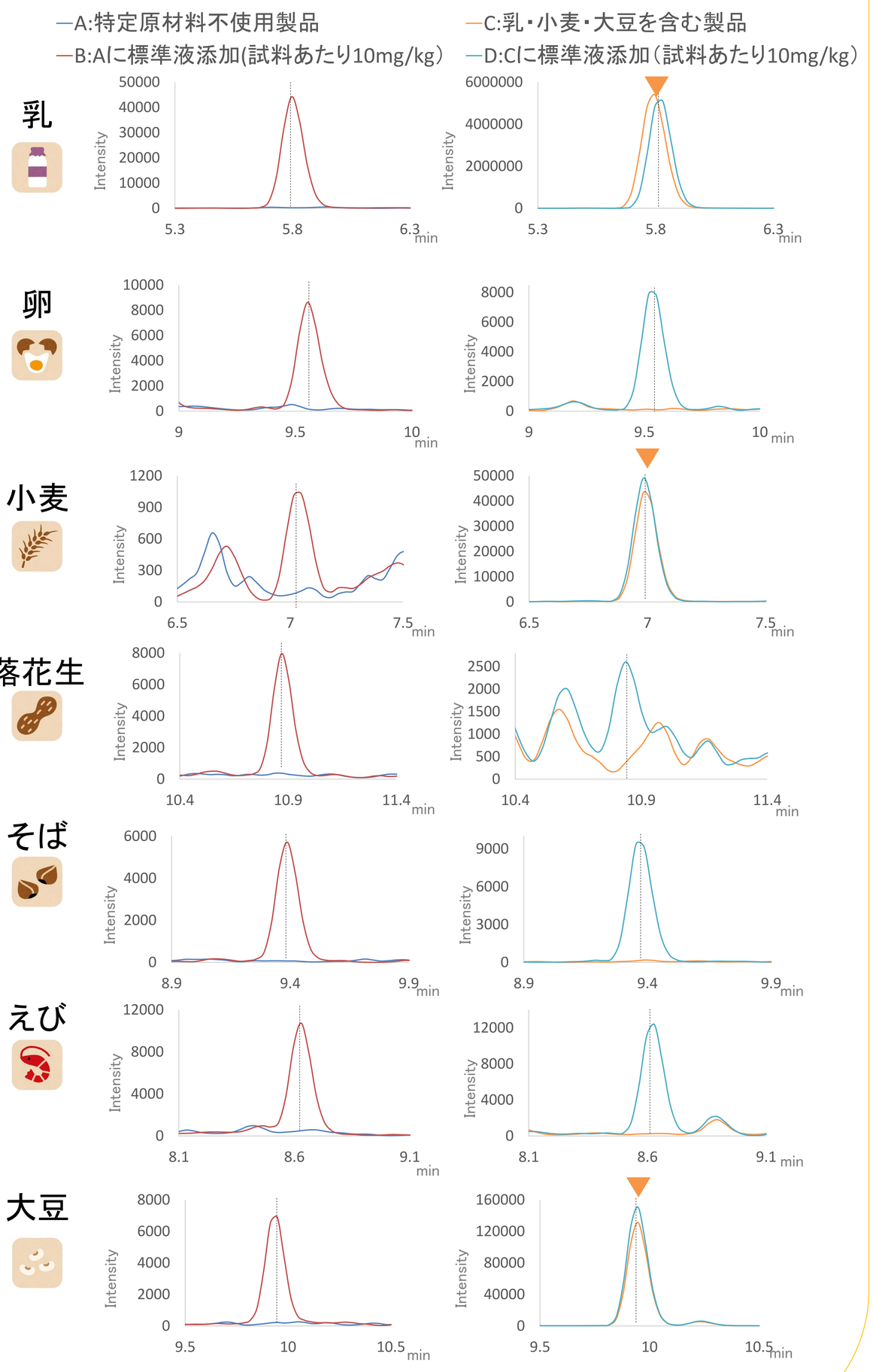

図6：LC-MS/MSを用いた食物アレルゲン一斉分析クロマトグラム（シチュー）

## まとめ

近年LC-MS/MSを用いたアレルゲン分析法がいくつか報告されているが、それらは市販標準品を使用していることが多く、特定のアレルゲンタンパク質を定量しており、通知法の定量値と異なる恐れがある。また、市販標準品の対象は、一部の品目に限られる。今回、通知法を参考にPTS法を用いて特定原材料および大豆のタンパク質抽出を行い、**品目毎に総タンパク質を含む標準液を作製し**、シチューの**アレルゲン一斉分析を行ったところ、対象品目のピークが同定できた**。ただし、一部の品目で、マトリクス効果により、ピーク強度が低くなった。今後は、マトリクス効果の検証や定量性の確認、直線性、再現性等について、検討する。将来的には、今回実施したアレルゲン品目以外の、特定原材料に準ずるもの20品目まで拡大させ、分析法を確立していく。

本研究は、（一財）雑賀技術研究所とSCIEXとの共同研究である。
＊参考文献：Masuda T, Tomita M, Ishihama Y , J Proteome Res. 2008 Feb;7(2):731-40.
日本食品化学学会第25回学術大会　2019/6/6-7　長野