アプリケーションノート

食品

Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS を用いたベビーフードの卵アレルゲン分析

著者

野口 智未

須永 幸恵

キユーピー株式会社

林 明生

安田 恭子

アジレント・テクノロジー株式会社

要旨

容器包装された加工食品では卵・乳・小麦・蕎麦・落花生・甲殻類・胡桃が含まれる場合、特定原材料として表示することが義務付けられています。マヨネーズの製造ラインでは卵の使用量が 1 年で 25 万トンである一方で、卵を使用しない商品も製造されているため、卵アレルゲンのコンタミネーションを起こさないように工程管理されています。一方で現在、消費者庁通知[1)]では食物アレルゲンの定量検査法として ELISA 法が、定性検査法として PCR 法やウェスタンブロット法が指定されていますが、ELISA 法であれば特定原材料毎に ELISA キットを用意する必要があります。そこで近年では、選択性が高く複数アレルゲンを一斉分析できる手法としてトリプル四重極 LC/MS（LC/TQ）を使用した、LC-MS/MS 法[2)]が注目されています。本アプリケーションではベビーフードを加工食品のモデルとし、卵アレルゲンがコンタミネーションしたことを想定して ELISA 法以外に LC-MS/MS 法でも検出・定量が可能かを検証しましたので報告します。

システム

Agilent InfinityLab LC システム
　1260 Infinity II フレキシブルポンプ（G7104C）
　1260 Infinity II マルチサンプラ（G7167A）
　1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116B）
Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS

分析条件

標準品

雑賀技術研究所製「食物由来アレルゲン抽出物　卵」を使用しました。

試料調製

市販のベビーフードから食物アレルゲン 7 品目不使用品であるおかゆ、肉じゃが、ももと白ぶどうにそれぞれ卵含有ベビーフードを混合し、モデル食品を作成しました。

前処理方法

試料の前処理には一般財団法人雑賀研究所より提供されたメソッドを用いました。抽出には相間移動溶解剤（PTS）試薬[3)]を用い、還元アルキル化、トリプシン消化、精製を行いました。

分析条件を表 1 および表 2 に示します。データ採取には MassHunter Data Acquisition ソフトウェアを用いました。また、解析には MassHunter Quantitative Analysis B12.0 を用いました。

表 1. 分析条件

LC 条件	
カラム	Poroshell120 EC-C18, 2.1*150 mm, 2.7 µm（Parts#. 693775-906）
移動相 A	0.1 % ギ酸水溶液
移動相 B	0.1 % ギ酸/アセトニトリル
流速	0.3 mL/min
グラジエント	B：2 %（0 min）→15 %（15 min）→60 %（20 min）
カラム温度	50 °C
注入量	5 µL
MS 条件	
イオン源	AJS ESI
極性	Positive
乾燥ガス	300 °C , 10 L/min
シースガス	350 °C , 12 L/min
ネブライザー圧力	40 psi
キャピラリー電圧	3500 V
ノズル電圧	500 V

表 2. 各消化ペプチドの MRM

配列名	ペプチド配列	RT（min）	Precursor *m/z*	Product *m/z*	フラグメンター（V）	CE（V）
アルブミン 1	HIATNAVLFFGR	19.61	673.4	1095.6 ※	120	27
アルブミン 1	HIATNAVLFFGR	19.61	673.4	1208.7	120	27
アルブミン 1	HIATNAVLFFGR	19.61	673.4	1025.6	120	27
アルブミン 2	VYLPR	14.55	324.2	385.3 ※	100	8
アルブミン 2	VYLPR	14.55	324.2	548.3	100	8
アルブミン 2	VYLPR	14.55	324.2	272.2	100	15
アルブミン 3	GGLEPINFQTAADQAR	19.35	844.4	666.3 ※	100	15
アルブミン 3	GGLEPINFQTAADQAR	19.35	844.4	1121.5	100	15
アルブミン 4	LEAEER	8.71	390.7	504.2 ※	100	15
アルブミン 4	LEAEER	8.71	390.7	667.3	100	15
アルブミン 4	LEAEER	8.71	780.4	780.4	100	15
リゾチーム	GTDVQAWIR	19.12	523.3	545.3 ※	110	15
リゾチーム	GTDVQAWIR	19.12	523.3	887.5	110	15
リゾチーム	GTDVQAWIR	19.12	523.3	673.4	110	15
オボトランスフェリン	SAGWNIPIGTLLHR	19.91	512.3	906.6 ※	70	21
オボトランスフェリン	SAGWNIPIGTLLHR	19.91	512.3	809.5	70	21
オボトランスフェリン	SAGWNIPIGTLLHR	19.91	512.3	696.4	70	21

※ 定量イオン

結果・考察

標準品を用いて各イオンで定量下限値～ 25 ppm（μg/g）の範囲で標準添加法により検量線を作成しました。全ての検量線で決定係数は 0.990 以上となりました。各イオンの定量下限値、決定係数、再現性は表 3 に示します。アルブミン 2 と 4 のイオンでは 0.1 ppm の濃度まで定量できたため、この2つの消化ペプチドで ELISA 法との比較を行いました。

表 3. 各ペプチドの標準品を用いた検証結果

配列名	定量下限値 (ppm)	決定係数 (R2)	再現性 (RSD%)	定量下限値における S/N
アルブミン 1	2.5	0.997	6.28	384.3
アルブミン 2	0.1	0.999	9.69	79.8
アルブミン 3	2.5	0.998	9.07	86.5
アルブミン 4	0.1	0.999	5.63	68.2
リゾチーム	1	0.993	27.03	84.5
オボトランスフェリン	2.5	0.990	31.04	77.5

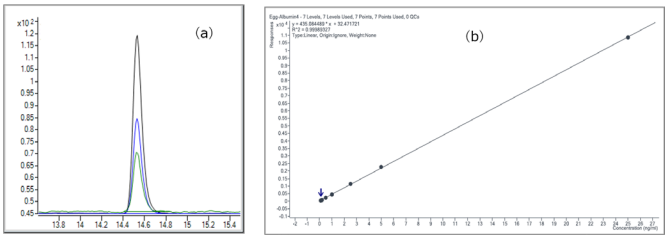

図 1. (a) アルブミン 2 の 0.1 ppm の標準品 MRM クロマトグラムと、(b) アルブミン 4 の 25 ppm までの検量線

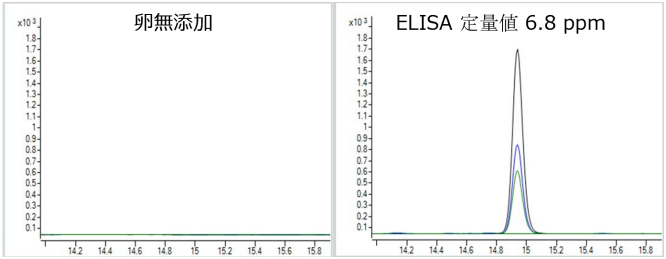

図 2. 無添加ベビーフードと卵モデル加工食品の MRM クロマトグラム

図 2 より、卵を添加していない無添加ベビーフードからは卵のピークが検出されなかったことから選択性に問題がないことが示唆されました。

次に、同一試料を ELISA と LC-MS/MS 法で測定し、それぞれの定量値を比較した結果を表 4、相関性を図 3 に示します。

表 4 より、卵入りモデル加工食品にて、ELISA 定量値 0.4 ppm に対して LC-MS/MS で同等の定量値が確認できました。これは ELISA の定量下限値とほぼ同等の濃度となります。複数の濃度を検証した結果、LC-MS/MS 法の方が ELISA 法よりも低く定量される傾向ではありますが、相関がみられることが示されました。LC-MS/MS 法の定量値が ELISA 法のものよりも低くなる理由は、LC-MS/MS の方がアレルゲンに対する選択性が高いためと考えられます。

表 4. ELISA と LC-MS/MS による定量値の比較

ELISA	LC-MS/MS, アルブミン 2	LC-MS/MS, アルブミン 4
0.4 ppm	0.4 ppm	0.3 ppm
1.0 ppm	0.6 ppm	0.6 ppm
6.8 ppm	4.0 ppm	4.3 ppm
9.5 ppm	6.5 ppm	6.9 ppm
15.6 ppm	10.3 ppm	10.4 ppm

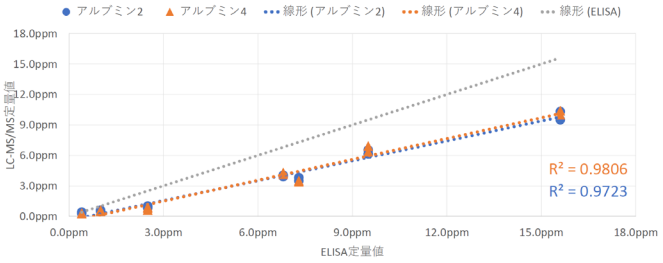

図 3. ELISA と LC-MS/MS による定量値の相関性

また、前述した方法で前処理された、濃度の異なるサンプルを 3 社が保有する LC-MS/MS にて同 MRM イオンで測定を行った結果を図 4 に示します。定量は全てアルブミン 2 で行いました。その結果、異なる装置を用いてもサンプル 1-3 で定量値に大きな差は見られませんでした。

使用した装置は、アジレント・テクノロジー株式会社：Ultivo トリプル四重極 LC/MS（一財）雑賀研究所：QTRAP5500（Sciex）でした。

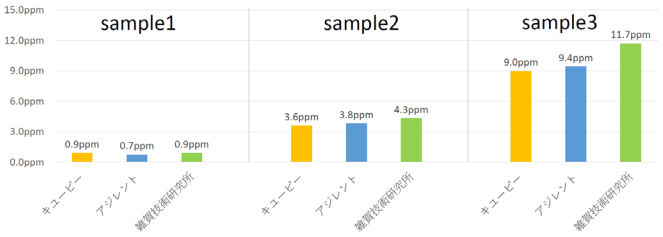

図 4. 各社保有装置によるアルブミン 2 の定量値

まとめ

食物アレルゲンの分析には現在、ELISA 法が用いられており、一斉分析が困難であるという観点からこの分野に LC-MS/MS を使用するアイデアが近年注目されていますが、従来技術である ELISA の結果との比較を行いました。おかゆや果実、おかず系ベビーフードに対して卵アレルゲン抽出物を添加してモデル加工食品を作成し、LC-MS/MS 法で検出・定量を行いました。その結果、LC-MS/MS 法でも ELISA 法と同程度の定量が可能であり、LC/MS/MS 装置が異なっても定量値は同様の結果が得られることが示されました。

参考文献

1) 消費者庁 別添 アレルゲンを含む食品に関する表示 https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/food_labeling_act/assets/food_labeling_cms201_240401_211.pdf
2) Lee Sun New *et al. J. AOAC INTERNATIONAL*, 2018, **101**, 132-145.
3) Takeshi Masuda *et al. J. Proteome Res*, 2008, **7**, 731-740.

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ
0120-477-111
email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE003017

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, March 26, 2025
5994-8272JAJP

Agilent
Trusted Answers