

ICP-MS 用 EAM 4.7 メソッドに従った 代替肉中の重金属および微量元素の測定

ICP-MS を用いた植物性タンパク質食品および細胞培地の
食品安全性分析



著者

Jenny Nelson, Agilent
Technologies, Inc.

Edward O' Neill, Dave Block,
University of California, Davis,
USA

Sam Heckle, CEM Corporation,
USA

はじめに

人間は、身体が必要とするエネルギー量を維持するために、炭水化物、脂肪、タンパク質などの不可欠な微量栄養素を十分な量だけ摂取する必要があります。タンパク質は、体組織の成長、発育、および修復に必要であり、特に筋肉の増強と維持および骨の健康に重要になります。肉、鳥肉、魚、乳製品、および卵は、主なタンパク源であり、植物由来のタンパク源として、大豆、豆、ナッツ、レンズマメ、穀物、シリアル、果物、野菜があります。理由が、倫理的、食事療法、健康面、社会的であるかにかかわらず、世界中で完全菜食主義者になるか菜食を採用するか、または動物由来の食品の摂取を控える人の数が増えています。気候および天然資源に対して集約的に飼育された家畜が与える影響への懸念により、多くの人々が食事で肉の量を制限したほうがよいと信じ込んでしまう傾向があります (1)。

食品業界は、肉類を含まない食品の人気上昇していることを認識しており、この要求を満たすための工程および製品について積極的に調査しています。肉類を含まない食品を求める傾向は、スーパーマーケットの棚に置かれていたり、ファストフードの直販店やレストランのメニューに記載されたりしている代替タンパク質製品の数が増え続けていることに現れています。一部の食品企業はすでに、バイオリアクタで成長させた動物由来の細胞の肉組織を培養して製造した製品を販売しています。

非肉由来のタンパク質または培養タンパク質製品が食用として安全であることを保証するために、メーカーは適正製造規範 (GMP) に適合する必要があります。通常、GMP ガイドラインでは、食品の製造、試験、および品質保証に関するガイダンスが提供されています。食品の安全性分析には、化学物質の試験が含まれています。これらの化学物質は、例えば、残留農薬のような有機汚染物質、また重金属のような無機汚染物質であり、食品中で管理されています。米国食品医薬品局 (US FDA) ではさまざまな食品を規制しており、ラボが食品の安全性を保証するために使用する分析メソッドを公開しています。例えば、FDA 元素分析マニュアル (EAM) 4.7 は、マイクロ波による酸分解を使用して前処理した食品分解物中の 12 元素を ICP-MS により測定する方法について記述した包括的なメソッドです。EAM 4.7 は、分析者が機器性能とデータ精度を示すことができるように一連の品質管理 (QC) 試験についても説明しています (2)。企業が細胞由来の代替肉の製造、輸入、または輸出をする場合、ターゲットとなる各市場において規制当局の承認が必要になることがあります。ただし、EAM 4.7 のような既存の食品分析試験が、新しく開発された細胞培養食品に適用できる可能性があります。

この研究では、Agilent 7850 ICP-MS と Agilent SPS 4 オートサンブラを使用して、複数の植物由来の代替肉サンプル中の 30 元素および細胞培地溶液中の 29 元素を分析する方法について説明します。Be は、植物性タンパク質の一連の分析に含まれていましたが、細胞培地研究の対象分析物ではありませんでした。分析法は 7850 ICP-MS を使用した以前の食品分析メソッドを作り替えました (3)。元素のリストには、EAM 4.7 で規定されている重金属および微量元素であるヒ素、カドミウム、クロム、銅、鉛、マンガン、水銀、モリブデン、ニッケル、セレン、タリウム、および亜鉛の 12 元素すべてを設定しました。さらに、アルミニウム、アンチモン、バリウム、ベリリウム、ホウ素、カルシウム、コバルト、鉄、マグネシウム、リン、カリウム、銀、ナトリウム、ストロンチウム、硫黄、スズ、チタン、およびバナジウムの微量元素および主要元素の分析も行いました。

これらの元素の分析から得られたデータの品質を、4 種類の食品認証標準物質 (CRM)、1 種類の添加メソッドブランク (FMB)、および植物由来の代替肉食品の 4 種類の添加分析部分 (FAP) の測定により評価しました。FAP とは、サンプル前処理の前に添加されるサンプルのことです。

今回の実験では、液体細胞培地の FMB と細胞培地の FAP、使用済み細胞培地、およびコンディショニングした使用済み細胞培地も前処理して分析しました。

実験方法

標準液

標準液を、2 % 硝酸 (HNO₃) および 0.5 % 塩酸 (HCl) で調製しました。HCl は、Agilent ICP-MS を使用した分析の際に日常的にサンプルに加えられています。これは、Hg のような化学的に不安定な元素を溶液中に保持するためです。形成された Cl ベースの多原子イオン干渉は、標準のヘリウム (He) コリジョンセルモードで簡単にコントロールできます (4)。環境標準液 (p/n 5183-4688) を含む Agilent 標準溶液から標準液を調製しました。Hg (p/n 5190-8485)、S (p/n 5190-8210)、P (p/n 5190-8428)、B (p/n 5190-8254)、Ti (p/n 5190-8545)、Sr (p/n 5190-8527)、および Sn (p/n 5190-8543) については、Agilent 単一標準液を使用しました。大部分の微量元素は 0.1 ~ 25 ppb の範囲で検量線を作成しました。Cu、Zn、および Mn は最大 250 ppb の範囲で検量線を作成しました。Hg は 0.01 ~ 2.5 ppb の範囲で検量線を作成しました。鉍物元素は 5 ~ 25,000 ppb の範囲で検量線を作成しました。

2 ppm の ⁶Li、Sc、Ge、Rh、Tb、および Bi を含む内部標準 (ISTD) 溶液 (Agilent p/n 8188-6525) を、1 % HNO₃、0.5 % HCl、および 10 % イソプロパノール (IPA) で調整しました。4.7 メソッドに従って IPA を ISTD に加え、溶液中の炭素濃度を一定にしました。このアプローチは、マイクロ波分解後のサンプル中にさまざまな濃度の残留炭素が存在する際に、As および Se の感度に影響を及ぼす可能性のあるイオン化の向上を回避するのに役に立ちます。ISTD 溶液を、サンプル流量の約 16 分の 1 の流量でオンラインにより自動的に添加しました。

標準物質およびサンプル

米国国立標準技術研究所 (NIST、ゲイサーズバーグ、米国) の 4 種類の食品マトリックス SRM を使用して、メソッドをバリデーションしました。SRM は、NIST 1577c ウシ肝臓、NIST 1947 ミシガン湖魚組織、NIST 1549a 全脂粉乳、NIST 1568b 米粉でした。植物由来の代替肉サンプル (フライドチキン、ビーフバーガー、牛ひき肉の非肉相当品) は、米国のノースカロライナ州のスーパーマーケットで購入しました。さまざまな液体培地サンプルは、カリフォルニア大学デービス校で実施された研究プロジェクトから入手しました (5)。細胞培地製剤は、40 % ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、40 % Ham's F-10 栄養素混合物、20 % ウン胎児血清 (FBS) で構成しました。

標準とサンプル前処理

SRM および植物由来の代替肉食品サンプルはすべて、EAM 4.7 メソッドで規定されている分解手順に従って、受け取り時のまま（均一化および水分除去なし）前処理しました。米国の CEM Corporation にある MARS 6 マイクロ波分解システムを使用しました。サンプルを正確に計量して（約 0.5 g の食品または SRM）、75 mL PFA Xpress 容器に移した後、8 mL の HNO₃ および 1 mL の H₂O₂ を容器に加えました。次に表 1 に示す加熱プログラムに従って、サンプル、SRM、および添加サンプル（FAP）を 1 回のバッチで 2 回繰り返して分解しました。1 回の分解バッチで最大 40 種類の食品サンプルマトリックスに対応し、1 つのプログラムで対応できます。分解後に、0.5 mL HCl を分解物に加え、脱イオン水により最終重量を 100 g にしました。

表 1. マイクロ波分解システムのパラメータ

パラメータ	設定値
出力 (W)	1800
ランプ時間 (分)	25
ホールド時間 (分)	15
温度 (°C)	200

今回の実験では、カリフォルニア大学デービス校で代替肉サンプルの培養のために調合した 8 種類の液体細胞培地サンプルも分析しました。

サンプル 1 と 2 は、異なる時間インキュベートした未使用の同じ細胞培地製剤の異なるバッチから採取しました。結果として、化学組成が多少異なることが予測されました。サンプル 1 はボトルにある新鮮な培地であり、サンプル 2 はインキュベーターで 21 日間保管した後に分析しました。

サンプル 3、4、5 は、同じバッチの使用済み細胞培地であり、培地を使用して一次胚性鶏筋肉前駆細胞を 21 日間成長させた後に採取しました。使用済み培地は、細胞の採取後に残された細胞培地であるため、未使用の栄養素、蓄積した代謝物、および老廃物が含まれています。サンプル 3～5 は、「バイオロジカルレプリケート」、つまり同じ種類の細胞の 3 種類の別の培地をインキュベートするのに使用される培地であるため、組成が類似していることが予測されました。結果として、3 種類のサンプル間の化学組成の違いが、レプリケート培地間の代謝物のばらつきの原因になる場合があります。

サンプル 6、7、8 は、サンプル 3、4、5 で使用したのと同じバッチの培地サンプルでしたが、細胞を培地で 21 日間ではなく 14 日間成長させた後にサンプルとして採取しました。サンプル 6、7、8 もバイオロジカルレプリケートですが、サンプル 3～5 で使用したのと同じ種類の鶏胚細胞の 3 種類の異なる培地を成長させるために使用しました。

15 mg の各液体細胞培地サンプルを、ICP-MS で直接分析する前に、15 mL の 2 % HNO₃ および 0.5 % の HCl で（分解ではなく）希釈しました。細胞培地は貴重であるため、サンプルサイズを 15 mg に制限しました。

標準液、サンプル、および QC 溶液の分析シーケンスを図 1 に示します。10 サンプルごとの後に定期的に QC を自動挿入して、繰り返し分析しました。

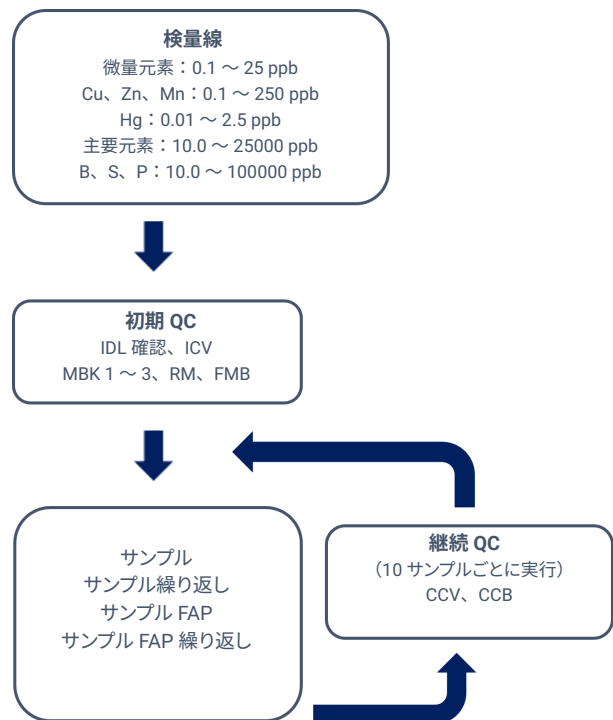


図 1. 分析シーケンス。

説明：機器検出下限 (IDL)、初期較正確認 (ICV)、メソッドブランク (MBK)、参照物質 (RM)、添加メソッドブランク (FMB)、添加分析部分 (FAP)、連続較正確認 (CCV)、連続較正ブランク (CCB)。

装置構成

分析には、ORS⁴ コリジョンセルおよびUHMIエアロゾル希釈システムを含む Agilent 7850 ICP-MS を使用しました。標準の ICP-MS サンプル導入系を使用しました。このシステムは、MicroMist ガラス製同軸ネブライザ、温度コントロール付き石英製スプレーチャンバ、および内径 2.5 mm のインジェクタ付き石英製トーチで構成しました。ニッケルめっき銅製サンプリングコーンを、ニッケル製スキマコーンとともに使用しました。

食品分解物試験に関する以前の経験に基づいて (3)、プリセットプラズマモード HMI-4 を選択しました。ここではサンプルに対して 4 倍のエアロゾル希釈係数を適用しています (6)。UHMI を選択した際には、表 2 の影付きの行で示されているように、マトリックスレベルのターゲットサンプルの種類に対して必要に応じて、プラズマ設定をオートチューンしています。機器の他の使用条件は、ICP-MS MassHunter オートチューン機能を使用して自動的に最適化しました。成分はすべて、ヘリウム (He) モードで取り込みました (P、S、As、Se の場合は高エネルギー He モード)。EAM 4.7 では、FDA 規制食品分析で使用する ICP-MS は、ヘリウムモードで操作して運動エネルギー弁別 (KED) を使用できる必要があると規定されています。反応性の高いセルガスは、リアクションプロダクトイオンの形成により、新しいスペクトル干渉を引き起こす危険性があるため、シングル四重極 ICP-MS で許容される代替物ではありません。ORS⁴ を He モードで操作することは、Agilent ICP-MS で使用される標準のメソッドです。その理由は、一般的な分析対象物すべてについて、代表的な多原子イオン干渉を確実に除去できるためです (4、7)。機器の使用条件を表 2 に示します。

表 2. Agilent 7850 ICP-MS の使用条件*

ICP-MS のパラメータ	設定値
RF 出力 (W)	1600
サンプリング深さ (mm)	10
キャリアガス流量 (L/min)	0.80
希釈 (UHMI) ガス流量 (L/min)	0.15
レンズチューン	オートチューン
ヘリウムセルガス流量 (mL/min)	4.3 (10**)
エネルギーディスクリミネーション (V)	5 (7**)

* 表中の網掛けされたパラメータは、メソッドおよび HMI-4 プラズマのプリセットで定義されている値です。すべてのパラメータは、起動およびオートチューン時に自動的に最適化されました。** P、S、As、Se で使用した高エネルギー He モード設定値。

結果と考察

代表的な検量線を図 2 に示します。Na、Mg、Mn、Cu、As、および Hg のプロットは、検量線範囲全体にわたって優れた直線性を示しており、相関係数は 0.9999 以上です。

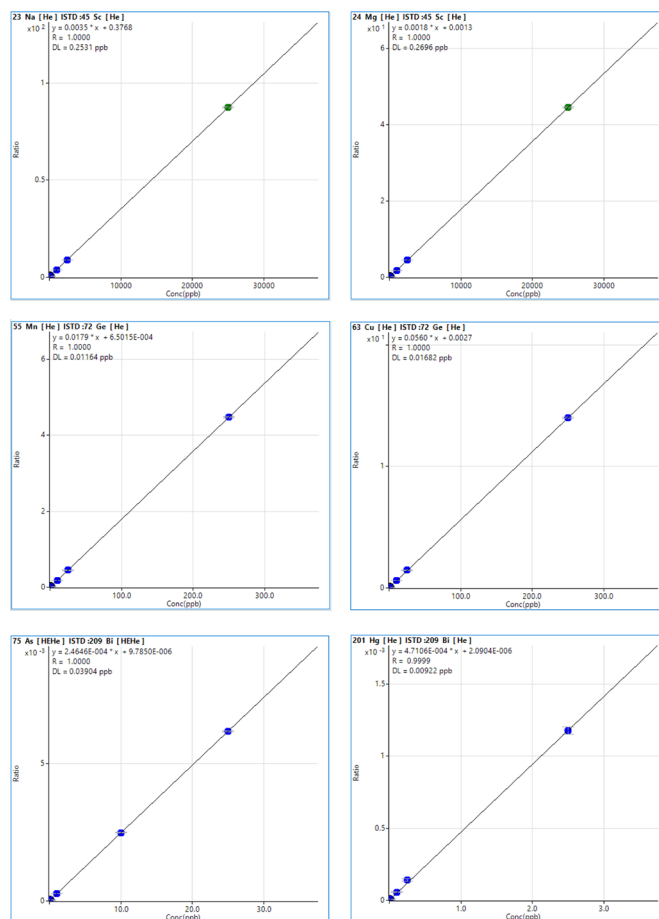


図 2. 主要元素および微量元素の代表的な検量線。

ICP-MS MassHunter の検量線から算出した代表的な Agilent 7850 ICP-MS の検出限界 (DL) を表 3 に示します。EAM メソッドの検出下限 (LOD) および定量下限 (LOQ) (表 3 も参照) は、分析の最後 (n = 10) で測定したメソッドブランクに基づいて計算しました (8)。すべての分析対象物で He セルガスを使用して、EAM 4.7 で必要な 12 元素を含む 30 元素に対してデータを取り込みました。

表 3. Agilent 7850 ICP-MS の検出下限値と EAM 4.7 の規定限界値 (提供されている場合)

元素	ICP-MS MassHunter		EAM 4.7 規定限界値に基づいた計算値		EAM 4.7 規定分析限界値	
	DL % b	BEC % b	LOD % b	LOQ % b	LOD % b	LOQ % b
9 Be	0.000	0.000	0.011	0.037	-	-
11 B	4.290	8.808	1.501	5.002	-	-
23 Na	7.410	275.1	7.505	25.02	-	-
24 Mg	0.140	0.384	0.141	0.471	-	-
27 Al	0.100	0.423	0.204	0.680	-	-
31 P	1.650	3.475	2.372	7.908	-	-
34 S	242.0	911.3	212.9	709.8	-	-
39 K	13.58	152.0	4.311	14.37	-	-
43 Ca	6.450	8.585	5.955	19.85	-	-
47 Ti	0.219	0.110	0.289	0.962	-	-
51 V	0.012	0.060	0.015	0.049	-	-
52 Cr	0.035	0.433	0.032	0.107	5.390	48.90
55 Mn	0.021	0.032	0.010	0.033	2.330	21.20
56 Fe	0.005	0.787	0.053	0.175	-	-
59 Co	0.001	0.002	0.001	0.003	-	-
60 Ni	0.024	0.024	0.006	0.020	6.380	58.00
63 Cu	0.006	0.055	0.018	0.060	6.020	54.70
66 Zn	0.159	1.003	0.116	0.387	37.40	340.0
75 As	0.029	0.043	0.004	0.014	1.270	11.60
78 Se	0.166	0.412	0.088	0.292	7.280	66.10
88 Sr	0.004	0.008	0.002	0.006	-	-
95 Mo	0.005	0.002	0.003	0.012	5.180	47.10
107 Ag	0.001	0.002	0.002	0.005	-	-
111 Cd	0.003	0.003	0.003	0.010	0.408	3.710
118 Sn	0.011	0.129	0.008	0.025	-	-
121 Sb	0.013	0.033	0.007	0.024	-	-
137 Ba	0.017	0.008	0.017	0.058	-	-
201 Hg	0.006	0.006	0.012	0.039	0.861	7.820
205 Tl	0.001	0.004	0.013	0.044	*0.281	*2.100
Pb**	0.002	0.024	0.001	0.005	1.200	10.90

元素はすべて、He モードで取り込みました (P、S、As、Se の場合は高エネルギー He モード)。規定分析限界値は EAM 4.7 に記載されており、1 年間にわたる単一ラボでのバリデーション時に測定されたメソッドブランクに基づいています (n = 143)。*単一ラボでのバリデーションに基づいた値 (n = 27) ** Pb は、最も豊富な 206、207、208 の 3 種類の同位体の合計により測定しました。

機器キャリブレーションとサンプル分解プロセスの検証

EAM 4.7 で規定されているメソッド品質管理手順の一部として、また検量線の有効性を継続して確認するために、分析シーケンス時に CCV 標準を 5 回分析しました。試験した大部分の元素で、CCV の実際の濃度の ±10 % という EAM 許容基準以内の回収率を示しました（結果の記載なし）。

サンプル分解プロセスおよび分析メソッドの精度を検証するために、7850 ICP-MS を使用して 4 種類の NIST SRM を 2 セットずつ 2 回繰り返し分析しました。表 4 に示すように、認証値と良好に一致しており、FDA EAM メソッドの QC 基準要件である 80 ~ 120 % を満たしていました。すべての SRM がすべての成分に対して認証されているとは限らず、ブランクのセルは認証値または参照値が存在しないことを示しています。

表 4. Agilent 7850 ICP-MS を使用した NIST 食品ベースの SRM 4 種類の平均測定濃度。各サンプルを 3 回に分けて分解し、3 回繰り返した (n = 9) の平均値

元素	NIST 1577c ウシ肝臓					NIST 1947 ミシガン湖魚組織				
	濃度単位	認証濃度	平均測定濃度	回収率 (%) *	QC 基準 (80 ~ 120 %) **	濃度単位	認証濃度	平均測定濃度	回収率 (%) *	QC 基準 (80 ~ 120 %) **
²³ Na	mg/kg	2033	2039	100	合格	-	-	-	-	-
²⁴ Mg	mg/kg	620	614	99	合格	-	-	-	-	-
³¹ P	mg/kg	11,750 R	12,189	104	合格	-	-	-	-	-
³⁴ S	mg/kg	7490	7541	101	合格	-	-	-	-	-
³⁹ K	mg/kg	10,230	10,195	100	合格	-	-	-	-	-
⁴³ Ca	mg/kg	131	115	88	合格	-	-	-	-	-
⁵¹ V	µg/kg	8.17	8.52	104	合格	-	-	-	-	-
⁵² Cr	µg/kg	53	57	107	合格	-	-	-	-	-
⁵⁵ Mn	mg/kg	10.46	10.18	97	合格	mg/kg	0.076	0.071	93	合格
⁵⁶ Fe	mg/kg	197.94	199.86	101	合格	mg/kg	3.79	3.38	89	合格
⁵⁹ Co	mg/kg	0.300	0.307	102	合格	-	-	-	-	-
⁶⁰ Ni	µg/kg	44.5	49.3	111	合格	-	-	-	-	-
⁶³ Cu	mg/kg	275.2	256.8	93	合格	mg/kg	0.411	0.356	87	合格
⁶⁶ Zn	mg/kg	181.1	181.7	100	合格	mg/kg	2.66	2.44	92	合格
⁷⁵ As	µg/kg	19.6	22.7	116	合格	mg/kg	0.732	0.672	92	合格
⁷⁸ Se	mg/kg	2.031	2.182	107	合格	mg/kg	0.475	0.426	90	合格
⁸⁸ Sr	µg/kg	95.3	96.8	102	合格	-	-	-	-	-
⁹⁵ Mo	mg/kg	3.30	3.49	106	合格	-	-	-	-	-
¹⁰⁷ Ag	µg/kg	5.9	6.1	104	合格	-	-	-	-	-
¹¹¹ Cd	µg/kg	97.0	98.4	101	合格	-	-	-	-	-
¹²¹ Sb	µg/kg	3.13 R	3.74	120	合格	-	-	-	-	-
²⁰¹ Hg	µg/kg	5.36 R	5.93	111	合格	mg/kg	0.254	0.274	108	合格
Pb	µg/kg	62.8	63.6	101	合格	-	-	-	-	-

Pb は、最も豊富な 206、207、208 の 3 種類の同位体の合計により測定しました。

表 4 は次のページに続く

表 4 の続き

元素	NIST 全脂粉乳 SRM 1549a					NIST 米粉 SRM 1568b				
	濃度単位	認証濃度	平均測定濃度	回収率 (%) *	QC 基準 (80 ~ 120 %) **	濃度単位	認証濃度	平均測定濃度	回収率 (%) *	QC 基準 (80 ~ 120 %) **
²³ Na	mg/kg	3176	3648	115	合格	-	-	-	-	-
²⁴ Mg	mg/kg	892	1018	114	合格	mg/kg	559	525	94	合格
³¹ P	mg/kg	7600	8792	116	合格	mg/kg	1530	1711	112	合格
³⁹ K	mg/kg	11920	13673	115	合格	mg/kg	1282	1307	102	合格
⁴³ Ca	mg/kg	8810	10195	115	合格	mg/kg	118.4	125.0	105	合格
⁵² Cr	-	-	-	-	-	mg/kg	118.4	124.5	105	合格
⁵⁵ Mn	mg/kg	0.184	0.189	103	合格	-	19.2	19.2	100	合格
⁵⁶ Fe	mg/kg	1.85 R	2.12	115	合格	-	7.42	7.68	104	合格
⁶³ Cu	-	-	-	-	-	mg/kg	2.35	2.39	102	合格
⁶⁶ Zn	mg/kg	33.8	34.7	103	合格	mg/kg	19.42	18.55	96	合格
⁷⁵ As	-	-	-	-	-	mg/kg	0.285	0.335	118	合格
⁷⁶ Se	mg/kg	0.242	0.288	119	合格	mg/kg	0.365	0.425	116	合格
¹¹¹ Cd	-	-	-	-	-	mg/kg	0.0224	0.0201	90	合格
²⁰¹ Hg	-	-	-	-	-	µg/kg	5.91	6.00	107	合格

R - リファレンス値。* FDA 元素分析マニュアル (セクション 3.4「Special Calculations (特別な計算)」) 3.4 の式 20。** NIST 認証値の FDA EAM 4.7 QC 基準 (80 ~ 120 %)。

マトリックス効果と添加回収率

非スペクトル干渉 (マトリックス効果) について試験するために、大部分の微量元素では 1 µg/kg、Al、Fe、Cu、Zn では 50 µg/kg、K、P、S を含む主要元素では 4000 µg/kg をブランクに添加することにより、FMB を調整しました。FMB は、分析全体を通して定期的に分析しました。表 5 に示すように、回収率はすべて EAM 4.7 メソッドで許容される回収率範囲の 90 ~ 110 % 以内に収まっていました。

添加回収率 (FAP) 試験を実施し、植物由来 (代替肉) 食品の分析における 7850 ICP-MS メソッドの精度を確認しました。各サンプルに、すべての元素を 1 または 50 µg/kg 添加し、7850 ICP-MS により測定しました。元素濃度が天然由来の 1 µg/kg 未満というサンプルの場合、1 µg/kg の添加が報告されています。濃度が天然由来より高いサンプルの場合、50 または 4000 µg/kg の添加回収率が報告されています。表 5 に示すように、植物由来の添加代替肉食品サンプル中のすべての元素の回収率は、EAM 4.7 メソッドの QC 基準である ±20 % 以内に収まっていました。

表 5. 平均回収率の結果は、レプリケートサンプル分解物の分析から求めて、各分析を Agilent 7850 ICP-MS で 2 回実施しました (n = 2)。低添加濃度は 1 µg/kg、高添加濃度は 50 または 4000 µg/kg でした。

	濃度単位	メソッドブランク			植物由来の「牛ひき肉」		
		メソッドブランク濃度	低添加での回収率 (%)	高添加での回収率 (%)	天然濃度	低添加での回収率 (%)	高添加での回収率 (%)
11 B	µg/kg	7.472	-	93	<LOD	-	111
23 Na	mg/kg	15.98	-	108	3650	-	*
24 Mg	mg/kg	<LOD	-	105	210.5	-	*
27 Al	µg/kg	0.448	106	101	2659	-	103
31 P	mg/kg	<LOD	-	96	2116	-	*
34 S	mg/kg	<LOD	-	**	1371	-	*
39 K	mg/kg	<LOD	-	105	2655	-	*
43 Ca	mg/kg	<LOD	-	102	1565	-	*
47 Ti	µg/kg	<LOD	102	91	152	-	103
51 V	µg/kg	<LOD	106	-	15.3	-	104
52 Cr	µg/kg	<LOD	106	-	89.2	-	103
55 Mn	µg/kg	<LOD	-	98	4085	-	104
56 Fe	mg/kg	0.859	-	106	33.16	-	*
59 Co	µg/kg	<LOD	105	-	35.2	-	104
60 Ni	µg/kg	<LOD	106	-	188	-	103
63 Cu	µg/kg	0.053	-	107	1615	-	105
66 Zn	mg/kg	<LOD	-	103	44.54	-	*
75 As	µg/kg	<LOD	104	-	16.3	-	109
78 Se	µg/kg	<LOD	104	-	78.0	101	98
88 Sr	µg/kg	<LOD	95	-	1686	-	92
95 Mo	µg/kg	<LOD	105	-	275	-	105
107 Ag	µg/kg	<LOD	-	102	1.481	-	92
111 Cd	µg/kg	<LOD	106	-	9.470	-	104
118 Sn	µg/kg	3.580	91	-	634	NA	
121 Sb	µg/kg	<LOD	104	-	<LOD	96	-
137 Ba	µg/kg	<LOD	103	-	391	-	100
201 Hg	µg/kg	<LOD	101	-	<LOD	111	-
205 Tl	µg/kg	<LOD	98	-	9.341	110	-
Pb***	µg/kg	<LOD	104	-	6.697	114	-

元素はすべて、He モードで取り込みました (P、S、As、Se の場合は高エネルギー He モード)。* 添加濃度が、天然濃度と比較して低すぎる場合、** キャリブレーション範囲を下回る場合。NA = 該当しない (測定していないため)。*** Pb は、最も豊富な 206、207、208 の 3 種類の同位体の合計により測定しました。

植物性タンパク質食品サンプルの定量結果

3種類の植物由来の代替肉食品サンプルの定量結果を表6に示します。EAM 4.7で規定されている12元素の他に、Be、B、Na、Mg、Al、P、S、K、Ca、Ti、V、Fe、Co、Sr、Ag、Sn、Sb、Baのデータも示しています。

表6. Agilent 7850 ICP-MSを使用して測定した、3種類の植物由来代替肉食品サンプルの定量結果 (n = 9)

	濃度単位	植物由来の「フライドチキン」	植物由来の「ビーフバーガー」	植物由来の「牛ひき肉」
9 Be	µg/kg	3.29 ± 2.64	3.51 ± 2.75	<LOD
11 B	µg/kg	2952 ± 204.6	2753 ± 153.5	<LOD
23 Na	mg/kg	10293 ± 350	2537 ± 48	3650 ± 231
24 Mg	mg/kg	281 ± 26360	627 ± 24679	210 ± 34
27 Al	µg/kg	65704 ± 28678	1291 ± 124.9	2659 ± 520.7
31 P	mg/kg	3291 ± 242784	1874 ± 76	2116 ± 312
34 S	mg/kg	24576 ± 434	1756 ± 68	1371 ± 237
39 K	mg/kg	1920 ± 91	4416 ± 86	2655 ± 161
43 Ca	mg/kg	169 ± 9	1025 ± 38	156 ± 22
47 Ti	µg/kg	63362 ± 17691	81.80 ± 11.98	152.4 ± 44.53
51 V	µg/kg	42.92 ± 11.86	8.21 ± 2.92	15.35 ± 1.43
52 Cr	µg/kg	190.7 ± 58.17	178.9 ± 8.71	89.19 ± 13.72
55 Mn	µg/kg	5610 ± 592.5	11450 ± 561.5	4085 ± 856.3
56 Fe	µg/kg	43416 ± 5195	33040 ± 410.0	33159 ± 6752
59 Co	µg/kg	583.5 ± 142.3	1085 ± 75.93	35.17 ± 4.59
60 Ni	µg/kg	581.8 ± 25.01	147.2 ± 19.20	188.5 ± 12.62
63 Cu	µg/kg	4201 ± 861.6	2295 ± 42.85	1615 ± 286.5
66 Zn	µg/kg	13990 ± 989.2	46159 ± 405.1	44540 ± 3098
75 As	µg/kg	30.39 ± 4.48	12.97 ± 3.21	16.35 ± 2.40
78 Se	µg/kg	82.22 ± 28.25	67.56 ± 11.85	78.04 ± 11.96
88 Sr	µg/kg	1272 ± 160.2	2467 ± 157.0	1686 ± 165.5
95 Mo	µg/kg	902.2 ± 121.9	856.1 ± 22.26	274.8 ± 45.87
107 Ag	µg/kg	14.10 ± 18.89	2.41 ± 0.76	1.48 ± 0.41
111 Cd	µg/kg	14.07 ± 1.34	9.91 ± 1.54	9.47 ± 1.28
118 Sn	µg/kg	684.7 ± 24.55	697.8 ± 26.94	634.2 ± 13.62
121 Sb	µg/kg	<LOD	<LOD	<LOD
137 Ba	µg/kg	861.2 ± 44.50	2691 ± 177.15	390.6 ± 80.28
201 Hg	µg/kg	<LOD	<LOD	<LOD
205 Tl	µg/kg	34.15 ± 29.97	7.15 ± 1.61	9.34 ± 0.80
Pb*	µg/kg	19.53 ± 0.89	21.48 ± 5.91	6.70 ± 1.10

元素はすべて、Heモードで取り込みました (P、S、As、Seの場合は高エネルギーHeモード)。* Pbは、最も豊富な206、207、208の3種類の同位体の合計により測定しました。

細胞由来サンプルの定量結果と添加回収率

液体細胞培地、使用済み培地、コンディショニングした使用済み培地サンプルのメソッドブランク、定量結果、および添加回収率データ (FMBおよびFAP) を、表7、8、9に示します。サンプルは、細胞培地の異なるバッチから採取したため、同じサンプルの種類で測定した一部の元素の濃度に違いが認められました (表8および9)。培地中のFBSは、複雑で大部分が定義されておらず変わりやすい製品で、細胞培地に適しているため、ばらつきの原因である可能性があります (例えば、サンプル3中のPbの濃度が高い)。培養した肉細胞培地において、FBSを植物由来の食品原材料に置き換えるためのコスト効率の高い方法を見つける研究が進行中です。

非スペクトル干渉 (マトリックス効果) について試験するために、ブランクに10、1000または4000 ppbを添加して、2種類のFMBを調整しました。Na、Mg、Ca、Feでは1000 ppbを添加し、P、S、Kでは4000 ppbを添加しました。残りの微量元素では、10 ppbを添加しました。FMBは、サンプル分析全体を通して定期的に分析しました。表7に示すように、回収率はすべてEAM 4.7メソッドで許容される回収率範囲の90~110%以内に収まっていました。

添加回収率 (FAP) 試験を実施し、液体細胞培地の分析における7850 ICP-MSメソッドの精度を確認しました。8種類の細胞培地サンプルに、微量元素を10 ppb、主要元素を1000 ppb添加しました。表7~9に示すように、細胞培地サンプル中のすべての元素の回収率は、EAM 4.7メソッドのQC基準である±20%以内に収まっていました。

表 7. 液体培地サンプルのメソッドブランク、定量結果 (n = 9)、および添加回収率

	濃度単位	メソッドブランク			液体細胞培地			
		メソッドブランク濃度	低添加での回収率 (%)	高添加での回収率 (%)	サンプル 1		サンプル 2	
					液体培地 (細胞なし)	回収率 (%)	液体培地 (細胞なし)	回収率 (%)
11 B	µg/kg	7.472	-	93	<LOD	103	<LOD	96
23 Na	mg/kg	15.98	-	108	2152	*	9913	*
24 Mg	mg/kg	<LOD	-	105	11.63	104	36.34	104
27 Al	µg/kg	0.448	106	101	<LOD	113	<LOD	109
31 P	mg/kg	<LOD	-	96	32.77	104	137.42	106
34 S	mg/kg	<LOD	-	**	<LOD	101	<LOD	98
39 K	mg/kg	<LOD	-	105	166.8	99	691.5	80
43 Ca	mg/kg	<LOD	-	102	30.92	102	125.1	99
47 Ti	µg/kg	<LOD	102	-	<LOD	98	<LOD	102
51 V	µg/kg	<LOD	106	-	<LOD	102	<LOD	101
52 Cr	µg/kg	<LOD	106	-	<LOD	101	<LOD	100
55 Mn	µg/kg	<LOD	-	98	<LOD	103	<LOD	101
56 Fe	mg/kg	0.859	-	106	0.380	107	2.044	107
59 Co	mg/kg	<LOD	105	-	<LOD	101	0.065	101
60 Ni	µg/kg	<LOD	106	-	<LOD	102	<LOD	104
63 Cu	µg/kg	0.053	-	107	<LOD	105	0.104	105
66 Zn	µg/kg	<LOD	-	103	<LOD	104	1.265	112
75 As	µg/kg	<LOD	104	-	<LOD	101	<LOD	102
78 Se	µg/kg	<LOD	104	-	<LOD	99	<LOD	96
88 Sr	µg/kg	<LOD	95	-	<LOD	105	<LOD	106
95 Mo	mg/kg	<LOD	105	-	<LOD	102	0.011	103
107 Ag	µg/kg	<LOD	-	102	<LOD	81	<LOD	82
111 Cd	µg/kg	<LOD	106	-	<LOD	105	<LOD	106
118 Sn	µg/kg	3.580	91	-	<LOD	100	<LOD	103
121 Sb	µg/kg	<LOD	104	-	<LOD	106	<LOD	106
137 Ba	µg/kg	<LOD	103	-	<LOD	104	<LOD	104
201 Hg	µg/kg	<LOD	101	-	<LOD	115	<LOD	101
205 Tl	µg/kg	<LOD	98	-	<LOD	104	<LOD	105
Pb***	µg/kg	<LOD	104	-	<LOD	104	<LOD	105

元素はすべて、He モードで取り込みました (P、S、As、Se の場合は高エネルギー He モード)。* 添加濃度が、天然濃度と比較して低すぎる場合、** キャリブレーション範囲を下回る場合。*** Pb は、最も豊富な 206、207、208 の 3 種類の同位体の合計により測定しました。

表 8. 21 日間インキュベートした使用済み液体培地サンプルの定量結果 (n = 9) および添加回収率。

	一次胚性鶏筋肉前駆細胞を 21 日間培養するのに使用した後の使用済み培地						
	濃度単位	サンプル 3	回収率 (%)	サンプル 4	回収率 (%)	サンプル 5	回収率 (%)
11 B	µg/kg	<LOD	96	<LOD	103	<LOD	102
23 Na	mg/kg	1221	*	2228	*	6541	*
24 Mg	mg/kg	8.333	106	11.88	106	27.93	106
27 Al	µg/kg	<LOD	94	<LOD	111	<LOD	108
31 P	mg/kg	24.35	105	31.08	106	89.59	107
34 S	mg/kg	<LOD	100	<LOD	102	<LOD	104
39 K	mg/kg	102.5	82	154.1	104	446.7	108
43 Ca	mg/kg	48.99	108	25.09	105	79.14	108
47 Ti	µg/kg	<LOD	104	0.062	102	0.081	103
51 V	µg/kg	<LOD	102	<LOD	101	<LOD	102
52 Cr	µg/kg	<LOD	102	<LOD	103	<LOD	102
55 Mn	µg/kg	<LOD	104	0.014	103	<LOD	103
56 Fe	mg/kg	14.03	107	0.371	107	0.837	107
59 Co	mg/kg	<LOD	102	<LOD	101	<LOD	102
60 Ni	µg/kg	0.030	102	<LOD	102	<LOD	102
63 Cu	µg/kg	1.145	109	<LOD	106	<LOD	105
66 Zn	µg/kg	5.212	98	<LOD	105	0.423	105
75 As	µg/kg	3.724	100	6.749	100	6.463	100
78 Se	µg/kg	<LOD	98	<LOD	98	<LOD	99
88 Sr	µg/kg	<LOD	105	<LOD	104	<LOD	104
95 Mo	mg/kg	<LOD	102	<LOD	102	<LOD	103
107 Ag	µg/kg	<LOD	80	<LOD	80	<LOD	80
111 Cd	µg/kg	<LOD	104	<LOD	104	<LOD	104
118 Sn	µg/kg	<LOD	100	<LOD	99	<LOD	99
121 Sb	µg/kg	<LOD	104	<LOD	105	<LOD	105
137 Ba	µg/kg	<LOD	105	<LOD	104	<LOD	103
201 Hg	µg/kg	<LOD	117	<LOD	114	<LOD	119
205 Tl	µg/kg	3.813	104	4.235	104	6.944	104
Pb	µg/kg	228.7	100	0.058	104	<LOD	105

元素はすべて、He モードで取り込みました (P、S、As、Se の場合は高エネルギー He モード)。* 添加濃度が、天然濃度と比較して低すぎる場合。** Pb は、最も豊富な 206、207、208 の 3 種類の同位体の合計により測定しました。

表 9. 14 日間インキュベートしてコンディショニングした液体培地サンプルの定量結果 (n = 9) および添加回収率。

	一次胚性鶏筋肉前駆細胞を 14 日間培養するのに使用した後の使用済み培地						
	濃度単位	サンプル 6	回収率 (%)	サンプル 7	回収率 (%)	サンプル 8	回収率 (%)
11 B	µg/kg	<LOD	103	<LOD	103	<LOD	104
23 Na	mg/kg	3457	*	1774	*	2378	*
24 Mg	mg/kg	18.08	107	9.834	106	14.39	106
27 Al	µg/kg	<LOD	114	<LOD	105	<LOD	109
31 P	mg/kg	46.33	109	23.92	106	39.31	107
34 S	mg/kg	<LOD	105	<LOD	103	<LOD	106
39 K	mg/kg	232.3	106	126.9	105	159.7	104
43 Ca	mg/kg	42.79	110	20.72	104	32.27	104
47 Ti	µg/kg	<LOD	103	<LOD	104	<LOD	105
51 V	µg/kg	<LOD	103	<LOD	102	<LOD	102
52 Cr	µg/kg	<LOD	102	<LOD	103	<LOD	101
55 Mn	µg/kg	<LOD	104	<LOD	103	<LOD	102
56 Fe	mg/kg	0.683	108	0.280	107	0.794	106
59 Co	mg/kg	<LOD	103	0.013	102	0.015	101
60 Ni	µg/kg	<LOD	104	<LOD	104	<LOD	104
63 Cu	µg/kg	0.046	107	0.039	107	0.033	106
66 Zn	µg/kg	0.404	110	<LOD	106	<LOD	107
75 As	µg/kg	<LOD	103	<LOD	101	<LOD	100
78 Se	µg/kg	<LOD	101	<LOD	98	<LOD	99
88 Sr	µg/kg	<LOD	107	<LOD	106	<LOD	105
95 Mo	mg/kg	<LOD	104	<LOD	104	<LOD	103
107 Ag	µg/kg	<LOD	82	<LOD	82	<LOD	81
111 Cd	µg/kg	<LOD	106	<LOD	105	<LOD	106
118 Sn	µg/kg	<LOD	103	<LOD	102	<LOD	99
121 Sb	µg/kg	<LOD	106	<LOD	106	<LOD	104
137 Ba	µg/kg	0.407	106	<LOD	104	<LOD	104
201 Hg	µg/kg	<LOD	110	<LOD	108	<LOD	111
205 Tl	µg/kg	3.117	106	2.220	105	2.659	105
Pb**	µg/kg	0.381	106	<LOD	105	<LOD	105

元素はすべて、He モードで取り込みました (P、S、As、Se の場合は高エネルギー He モード)。* 添加濃度が、天然濃度と比較して低すぎる場合。** Pb は、最も豊富な 206、207、208 の 3 種類の同位体の合計により測定しました。

ISTD 回収率 (%)

図 1 に示した分析シーケンスを、48 時間にわたって繰り返し実施しました。すべての ISTD 回収率プロットは ±20 % 以内に収まっており、分析を通して内部標準エラーはなく、EAM 4.7 で規定されている基準を満たしていました (図 3)。この結果から、長時間の分析においても、7850 ICP-MS は高い堅牢性を持ち、UHMI による高マトリックス耐性が示されています。

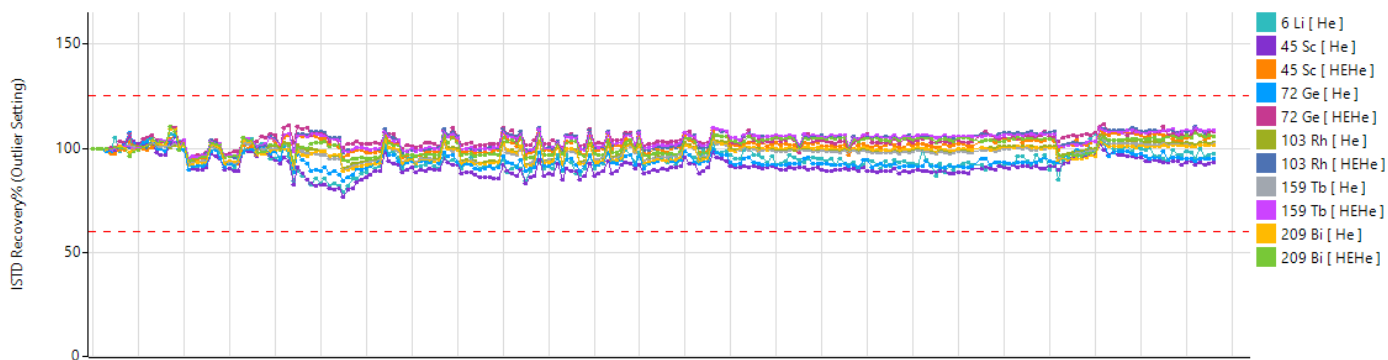


図 3. 48 時間にわたる ISTD 測定値の安定性。すべてのサンプルについて、ISTD 回収率をキャリブレーションブランクで正規化しました。

IntelliQuant データ

分析者が ICP-MS MassHunter プリセットメソッドを使用して定量メソッドを作成する場合、IntelliQuant Quick Scan 取り込みは He モードのチューンステップで事前定義されています。IntelliQuant では特別な設定も別の検量線も必要ないため、分析が簡略化されます。IntelliQuant は、わずか 2 秒の追加測定時間ですべてのサンプルのフル質量スペクトルデータを自動的に取り込むことができ、分析者はサンプル中に存在する元素を即座に確認できます。IntelliQuant データは He コリジョンセルモードで取り込まれるため、分析者は一般的な多原子イオン干渉を発生させずに、データの品質を保証できます。

今回の実験では、7850 ICP-MS を He モードで動作させて、各植物由来食品サンプルおよび SRM の IntelliQuant データを取り込みました。図 4 の植物由来の「牛ひき肉」サンプルが示すように、周期表ヒートマップ表示としてデータを表示できます。ヒートマップには、各サンプル中の最大 78 元素のおおまかな濃度が表示されており、色が濃くなるほどその元素の濃度が高いことを示しています。IntelliQuant データは、サンプルの元素含有量の概要を示して、予期しない元素の存在を同定するための迅速でシンプルな方法です。

図 4 は、植物由来の「牛ひき肉」サンプルに、比較的高濃度の Rb が含まれていたことを示しています。Rb は、定量実験の中で検量線が作成されていないため、IntelliQuant の天然同位体テンプレート機能を使用して Quick Scan スペクトルより、同定しました。図 5 は、Rb の天然同位体テンプレートに良好に一致していることを示しており、Rb がサンプル中に存在していることを確認しました。

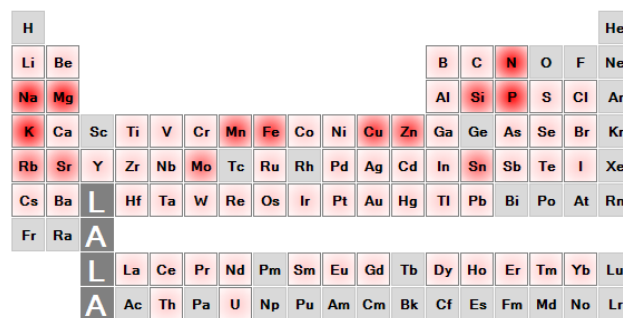


図 4. 植物由来の「牛ひき肉」サンプルから取得した ICP-MS IntelliQuant データの周期表ヒートマップ表示

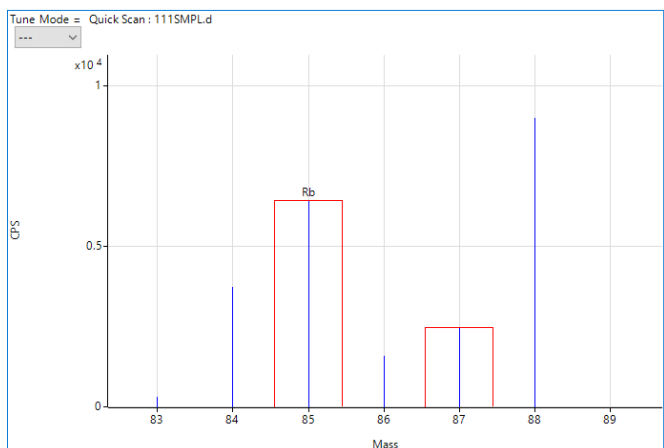


図 5. IntelliQuant Quick Scan 質量スペクトルで同位体テンプレート適合機能を使用して、植物由来の「牛ひき肉」サンプル中の Rb の濃度が予想以上に高いことを確認しました。

結論

Agilent 7850 ICP-MS を使用して、さまざまな植物性タンパク質食品中の 30 元素、およびさまざまな細胞培地中の 29 元素を分析しました。US FDA EAM メソッド 4.7 に従って、食品および関連製品の分析を実施しました。分析には 4.7 メソッドで規定されている 12 元素を含めました。食品サンプルはすべて、単一のマイクロ波分解メソッドを使用して同じバッチで前処理しましたが、細胞培地サンプルは分析前に希釈しただけでした。

7850 ICP-MS メソッドは、以前の EAM 4.7 食品分析バッチに基づいて事前定義し、機器をオートチューンすることにより、メソッド作成を短縮しました。元素はすべて、単一データ取り込みモードを使用して測定しており、ORS⁴ コリジョンセルを He-KED モードで操作することにより、多原子イオン干渉を確実に効果的に除去しました。さらに、He-KED モードを使用した定量メソッドの一環として、サンプルごとに IntelliQuant データを取り込みました。植物由来の「牛ひき肉」サンプルの IntelliQuant データを周期表のヒートマップとして表示し、測定した元素ごとにおおまかな濃度範囲を示しました。IntelliQuant の同位体テンプレートを使用して、ルビジウムのような、植物由来の「牛ひき肉」サンプル中の検量線のない元素を同定しました。

4 種類の食品ベースの SRM を分析して、植物由来の「牛ひき肉」サンプルに対して添加回収率試験を実施し、定量メソッドの精度を評価しました。両方の試験において優れた回収率を達成しており、それぞれ EAM 4.7 メソッドの QC 基準である $\pm 10\%$ および $\pm 20\%$ 以内に収まっていました。7850 ICP-MS は、EAM メソッドで規定されている公称検出限界要件を上回っていました。さらに、7850 で UHMI エアゾール希釈技術を使用した場合、48 時間にわたる ISTD 回収率で優れた安定性を示しており、メソッドの堅牢性も実証されました。

また、同じ 7850 ICP-MS メソッドを使用して、さまざまな液体細胞培地サンプルおよび添加サンプルも分析しました。8 種類のサンプルにおいて良好な添加回収率データが得られており、このメソッドが食品業界の成長市場である培養肉製品の開発をサポートするのに適していることを確認しました。

参考文献

1. Keren Dopelt, Pnina Radon, Nadav Davidovitch, Environmental Effects of the Livestock Industry: The Relationship between Knowledge, Attitudes, and Behavior among Students in Israel, Int J Environ Res Public Health, **2019**, 16(8): 1359
2. Patrick J. Gray, William R. Mindak, John Cheng, US FDA Elemental Analysis Manual, 4.7 Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination of Arsenic, Cadmium, Chromium, Lead, Mercury, and Other Elements in Food Using Microwave Assisted Digestion, Version 1.2 (February 2020), accessed July 2022, <https://www.fda.gov/media/87509/download>
3. Jenny Nelson, Elaine Hasty, Leanne Anderson, Macy Harris, US FDA EAM 4.7 ICP-MS メソッドに従った 食品中の元素測定, Agilent publication, [5994-2839JAJP](#)
4. Octopole Collision/Reaction Cell and Helium mode, Agilent publication, [5994-1172EN](#)
5. Edward O'Neill, Joshua Ansel, Grace Kwong, Michael Plastino, Jenny Nelson, Keith Baar, David Block. Spent media analysis suggests cultivated meat media will require species and cell type optimization. NPJ Sci. Food. Accepted August 2022
6. Ultra High Matrix Introduction, Agilent ICP-MS technology brief, [5994-1170EN](#)
7. ヘリウムモードのセル性能強化によるICP-MS の干渉除去の向上, Agilent publication, [5990-7573JAJP](#)
8. William C. Cunningham, William R. Mindak, Stephen G. Capar, US FDA Elemental Analysis Manual For Food and Related Products, 3.2 Terminology, 2014, accessed July 2022, <https://www.fda.gov/media/89337/download>

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンター

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。

DE65046313

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, September 8, 2022

5994-5181JAJP

