

令和元年6月28日現在

機関番号：84406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14931

研究課題名（和文）LC-ESI-MS/MSにおけるマトリックス効果抑制への計量化学的アプローチ

研究課題名（英文）Chemometric approach to matrix effect suppression in LC-ESI-MS/MS

研究代表者

浅川 大地 (Daichi, Asakawa)

大阪市立環境科学研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：80470251

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：食品中の農薬や動物用医薬品の一斉分析等を行う際に測定阻害をもたらす、液体クロマトグラフ質量分析計におけるマトリックス効果の抑制に対する新規アプローチを行った。新規分析法の開発や各種検出器データを多変量解析可能な行列データに変換する手法を確立した。本研究によって、イオン化を阻害する夾雑成分の存在に加えて、移動相組成の変化や測定対象化合物のイオン化電圧もマトリックス効果に大きな影響を与えることが示された。マトリックス効果を効果的に抑制するためには、これらの要素を考慮する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異なる検出器データを統合して多変量解析を行うことで、従来とは異なる知見が得られることが示された。本研究の進展によって液体クロマトグラフ質量分析法のマトリックス効果が抑制されることで、食品中の残留農薬や動物用医薬品の分析精度が向上し、安全な食品の流通に貢献することが期待できる。また、マトリックス効果を抑制して信頼性の高い測定値を得ることは、食品科学のみでなく多くの研究分野での共通課題であるため、他分野への貢献も期待できる。

研究成果の概要（英文）：We conducted a novel approach to the suppression of the matrix effect in liquid chromatograph mass spectrometers, which causes measurement inhibition when performing simultaneous analysis of residual pesticides and veterinary drugs in foods. We developed a new analysis method and established a method to convert various detector data into matrix data that can be analyzed by multivariate analysis. The present study showed that, in addition to the presence of contaminating components that inhibit ionization, changes in the mobile phase composition and the ionization voltage of the target compound also have a significant effect on the matrix effect. It is necessary to consider a matrix effect suppression method that takes these factors into consideration.

研究分野：分析化学

キーワード：液体クロマトグラフ質量分析計 マトリックス効果 計量化学 食品分析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な学術分野において、化学物質の挙動を把握するために多くの成分を同時に定量可能な技術が求められている。食品分野では、農薬や動物用医薬品の多くの成分が感度と選択性に優れた液体クロマトグラフエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析計 (LC-ESI-MS/MS) で測定されている。しかし、食品抽出試料は多くの夾雑物を含むため、目的成分のイオン化効率が抑制または促進されるマトリクス効果が生じる。マトリクス効果は測定法の正確度や精度を低下させ、試料個体毎にその影響程度が異なるため、測定法の信頼性に強く影響する。そのため、精製方法や LC 条件の最適化、試料液の希釈、イオン化法の変更によるマトリクス効果の抑制が試みられている。ただし、幅広い物理化学性を示す多成分を同時に、かつ低濃度まで定量する場合には、これらの対策では限界がある。今後、多成分一斉分析法の信頼性を向上するためにはマトリクス効果の試料間差を把握し、関与する因子 (成分や溶液物性) を探索して効率よく除去することが必要である。

2. 研究の目的

LC-ESI-MS/MS による多成分一斉定量法の信頼性向上を目的として、ESI 法におけるマトリクス効果を抑制する新規手法の確立を目指す。マトリクス効果の抑制には、物理性や夾雑物組成が複雑に関与した因子を的確に除去する必要がある。そこで、LC 溶出液の有機溶媒濃度、電気伝導度、吸光スペクトル、蛍光スペクトルという質の異なるデータを統合して多次元配列データを生成し、多変量解析によって物理化学的データから成る因子に分解する。データの統合方法や解析アルゴリズムを最適化し、モデル化合物のマトリクス効果と相関性の高い因子を探索する。得られた因子のデータ構成からマトリクス効果を抑制する前処理法や補正法を提案・実証して、LC-ESI-MS/MS 法の信頼性向上を通じて安全な食品流通に貢献する。

3. 研究の方法

(1) データ取得条件の検討

多成分一斉分析法の改良

60 種以上の動物用医薬品類を一斉分析可能な逆相系固定相を用いた LC-ESI-MS/MS 法を実用化済みであったが、アミノグリコシド系抗生物質 (AGs) などの高極性化合物は測定不可能であった。そこで、測定可能成分数を拡大するために親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) による AGs の測定法を開発した。カラムには Merck 製の ZIC-HILIC シリーズ (ZIC-HILIC、ZIC-pHILIC、ZIC-cHILIC) をはじめ各カラムメーカーの HILIC カラムを使用した。また、検出感度を向上させるために、カラム溶出液にメタノールまたは酢酸ナトリウム含有メタノールを添加した。このとき、酢酸ナトリウムはイオン源で析出して測定に支障が出る可能性があるため、添加する酢酸ナトリウムの濃度には注意が必要である。測定には、Waters Acquity UPLC-Xevo TQ MS システムを用いた。

検出器の構成と測定条件の設定

LC-ESI-MS/MS に電気伝導度計 (EC) と吸光光度計 (PDA)、蛍光光度計 (FLD)、示唆屈折計 (RI) を組み込んだシステムの構築をめざして検討した。ESI-MS/MS は Sciex 製 TQ 4500、PDA と FLD は Agilent 製 1290 InfinityII を使用した。カラムには GL Science 製 Inertsil AQ-C18 (2.1 × 100mm、1.9 μm、PEEK 製、40 °C) を用いて、0.1%ギ酸水溶液 (移動相 A) とアセトニトリル (移動相 B) を流速 0.4 mL min⁻¹ でグラジエント溶出 (0-1 min; 10%B, 1-3 min; 10-25%B, 3-7 min; 25-30%B, 7-10 min; 30-50%B, 10-13 min; 50-100%B, 13-16 min; 100%B, 16-21 min; 10%B) を行った。畜水産試料はアセトニトリル-メタノール (1:1) と緩衝液 (0.01M EDTA、0.1M クエン酸、0.2M リン酸水素ナトリウム、pH4) で逐次抽出して、ヘキサソール洗浄と固相抽出 (GL Science 製 InertSep PLS-2) による精製を行い、濃縮とろ過後に 10 μL を注入した。カラム溶出液に動物用医薬品混合標準溶液を添加 (ポストカラム添加) して、それら標準物質の ESI-MS/MS シグナルの応答を記録した。各標準物質のマトリクス効果を比較し、イオン化促進と抑制を受けやすい標準物質を選択した。

(2) 多次元配列データの生成方法の検討と多変量解析によるスペクトル検量

各測定機のシグナルを統合して多次元配列データを作成する方法を検討した。通常、分析装置に記録される測定データは各機器メーカーの独自規格データ (バイナリーデータ) であるため、そのまま多変量解析に投入できない。そこで、測定データを多変量解析可能な行列データに変換する手法を検討した。まず、16 成分の動物用医薬品を含んだ標準溶液と養殖魚から調製した試料溶液を LC (逆相系) -ESI-MS/MS で測定した。得られた測定データをオープンソースソフトウェア (Proteo Wizard msConvert [1]) でテキストデータに変換した。また、Agilent 製 PDA と FLD の 3 次元データは独自にマクロを作成してテキストデータとして取り出した。

データの成型方法を確認するとともに、得られたデータ行列の予備解析としてスペクトル検量を試みた。解析には解析用ソフトウェア (MATLAB、2012a) とツールボックス (N-way tool box、MVC) を利用した。データセットによって最適な解析アルゴリズムは異なるため、LC-DAD データの解析方法を検討した報告を参考にして、Parallel Factor Analysis (PARAFAC) や Tucker、Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares (MCR-ALS) モデルの使用を検討した。

(3) マトリクス効果に影響を与える因子の解析

魚や肉、牛乳といった畜水産物試料を(1)で設定した抽出精製条件で調製して測定を行った。測定は LC-ESI-MS/MS と LC-PDA-FLD の 2 系統で実施した。LC-ESI-MS/MS では、8 種の動物用医薬品をモデル化合物としてポストカラム添加し、それらのマトリクス効果の時系列変化を記録した。PDA は 230-550 nm の波長範囲でスキャンデータを取得し、FLD は 280-770 nm の範囲で励起スキャンデータを取得した。取り込まれたデータを(2)で確立した手法でデータ処理を行い、多変量解析可能な行列データに変換した。次に、得られた行列データを MCR-ALS モデルの Argument モード(複数列のデータを 1 列に統合する解析モード)で解析を行った。得られた因子とモデル化合物のマトリクス効果との関連性を考察した。

4. 研究成果

(1) データ取得条件の検討

多成分一斉分析法の改良

残留動物用医薬品類のうち極性が高く従来の逆相系固定相を用いた LC-ESI-MS/MS 法では測定できなかった AGs の測定法開発を行った。各種 HILIC カラムを比較した結果、ZIC-chILIC(100 × 2.1mm、粒径 3 μm; Merck 製) カラムによって 10 種の AGs (スペクチノマイシン、ストレプトマイシン、ジヒドロストレプトマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ゲンタマイシン(A、C1、C2、C1a)、アミカシン) が良好に分離することが分かった。ただし、AGs は ESI-MS/MS で測定する際に通常検出されるプロトン付加体 ($[M+H]^+$) で測定すると感度が低い。そのため、類似構造を持つ化合物のイオン化促進法(糖化合物のアルカリ金属錯体形成)を参考にして、ナトリウム付加体 ($[M+Na]^+$) で検出することにした。ナトリウム付加体を安定かつ効率的に生成するために、カラム出口で 5mM 酢酸ナトリウム含有メタノールをポストカラム添加した。その結果、プロトン付加体に比較して 7~300 倍の高感度で AGs を測定することが可能になった。ただし、グアニジノ基を持つストレプトマイシンとジヒドロストレプトマイシンは $[M+H]^+$ の方が高感度であったので、 $[M+H]^+$ で測定することにした。また、畜水産試料からの抽出法や前処理法を最適化して、食品中の残留 AGs の定量方法を確立した。この定量方法の定量下限値は十分に低く (5.7~29 μg kg⁻¹)、妥当性評価結果は良好であり、所属自治体の行政検査に於いてすでに使用されている。国内で AGs の個別定量による残留農薬検査の例は他にはなく、国内初である。また、現在国内で広く実施されている生物学的スクリーニング法と今回開発した定量法を比較することで、スクリーニング法の精度検証などに利用されることが期待できる。

開発した定量方法を牛筋肉に適用したところ、AGs へのマトリクス効果は -83~+65% と幅広く、イオン化抑制を受ける化合物とイオン化促進を受ける化合物がみられた。したがって、本測定法に於いてもマトリクス効果の抑制は重要である。

検出器の構成と測定条件の設定

LC-ESI-MS/MS に EC と PDA、FLD、RI を組み込んだシステムの構築を検討した結果、設定した LC 分離条件では EC と RI は安定したシグナルを得られなかったため除外した。また、FLD を ESI-MS/MS の前段に組み込んだ場合、FLD の検出器セルの耐圧を超過する。ESI-MS/MS 導入前に溶出液をスプリッターで分岐する選択肢もあったが、今回は同時に動物用医薬品モデル化合物を別系統のポンプでポストカラム添加する必要があり、流速と圧力の安定性に懸念が生じた。従って、LC-ESI-MS/MS と LC-PDA-FLD の 2 系統で同一試料を測定することにした。ただし、保持時間を安定させるため、LC は同一の装置 (Agilent 1290 InfinityII) を使用した。動物用医薬品類の魚試料(サーモン)によるマトリクス効果を比較して、マトリクス効果が大きく(抑制または促進)比較的感度が良いモデル化合物を選択した。選択した化合物は、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、ピロミド酸、チアベンダゾール、チアムリン、スルフィソミジン、クレンプテロール、スルファニトランの 8 化合物である。このうちスルファニトランのみは ESI のネガティブモードでイオン化し、それ以外はポジティブモードでイオン化を行った。ポストカラム添加する際には、これらモデル化合物を各 20 ng mL⁻¹ で添加することにした。

(2) 多次元配列データの生成方法の検討と多変量解析によるスペクトル検量

16 成分の動物用医薬品を含んだ標準溶液と養殖魚から調製した試料溶液を LC (逆相系) -ESI-MS/MS で測定した。得られた測定データをオープンソースソフトウェア (Proteo Wizard msConvert) でテキストデータに変換した。このデータからクロマトグラムの時間とシグナル強度のデータを抽出し、データの成形を行った。多変量解析を実行するためには、全ての測定データの行列サイズが一致している必要がある。最終的に、一測定データを 361 行(保持時間値) × 32 列(16 成分 × 2MS/MS=32) の行列に成形した。Agilent 製 PDA と FLD の 3 次元スペクトルデータを効率的に変換するためには、独自にマクロを作成する必要があった。今後は、MS/MS データのみでなく他の検出器データにおいても、取り込んだデータをそのまま数理統計処理する解析法が増えてくると予想されるため、各機器メーカーのバイナリーデータの簡易かつ高速な変換手法が重要になると考えられた。

今回成形した測定データを用いて、多変量解析によるスペクトル検量を試行した。解析条件を検討したところ、MCR-ALS の Argument モードによる解析で、測定データから 16 因子が抽出された。得られた 16 因子の構成データ(プロファイル)は実際に取得したクロマトグラムとほぼ一致していた(図 1)。ただし、一部の因子はノイズシグナルを含んでいた。各試料データに

対する因子の負荷量を算出することで、各因子（成分）の濃度を計算した。一般的なピーク面積値による定量計算値と比較したところ、養殖魚検体中のヒドロコルチゾンとオキシテトラサイクリン濃度はほぼ同等の計算値を示した。したがって、多変量解析によるデータ解析が可能であることが示され、さらに今回のスペクトル検量方法は作業者がピークの確認などを行う必要がないため、多成分一斉定量計算の効率化に有効であると考えられた。

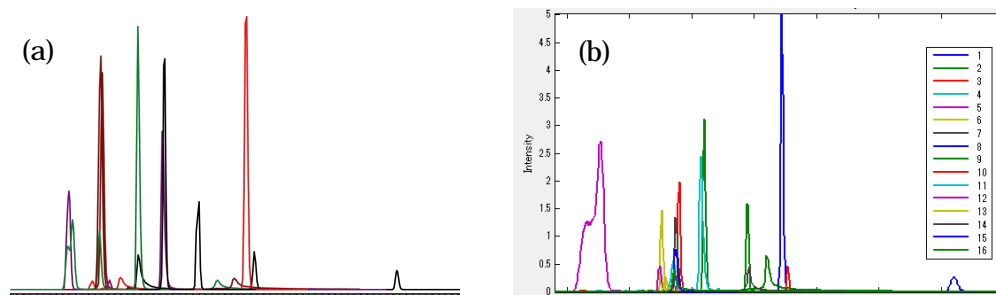


図1 標準液に含まれる 16 化合物のクロマトグラム (a) と多変量解析によって抽出された因子のプロファイル (b)

(3) マトリクス効果に影響を与える因子の解析

魚類 10 種、乳 4 種、肉類 6 種の試料に対するモデル化合物 (8 化合物) のマトリクス効果を LC-ESI-MS/MS で測定した。試料によってマトリクス効果は異なっていたが、食品種類によって類似した傾向がみられた。また、有機溶媒組成の影響を予想以上に受けていた。移動相 B が 100% になるとすべてのモデル化合物がイオン化抑制を顕著に受けた。これは、ESI のイオン化部に導入される液性 (表面張力、pH など) が変化したためだと考えられた。LC-PDA-FLD データを行列表データに変換した。このとき、データの軽量化のため、PDA データ (230-550 nm) は 8 nm 毎にシグナル強度を抽出し、FLD データ (280-770 nm) は 5 nm 毎に抽出した。データは 1213 行 (溶出時間 0.5-18.5min に相当) × 139 列 (PDA と FLD の波長数) に成型した。この行列データを MCR-ALS によって解析した結果、PDA や FLD で見られた大きなピーク群が因子として抽出され、その因子によってモデル化合物のイオン化阻害が生じていることが分かった。また、測定時間中の各モデル化合物のマトリクス効果 (ベースラインのシグナル強度を 1 とした時の相対値) を平均化した値は、モデル化合物のイオン化電圧が高いほど低くなった (図 2)。すなわち、ESI でイオン化する際にイオン化電圧が高いモデル化合物ほどイオン化阻害を受けやすく、イオン化電圧が低い化合物はイオン化促進を受けやすい傾向がみられた。この傾向は、魚類、乳、肉類に共通していた。本研究によって、イオン化を阻害する夾雑成分の存在に加えて、移動相組成の変化や測定対象化合物のイオン化電圧もマトリクス効果に大きな影響を与えることが示された。これらの要素を考慮したマトリクス効果の抑制手法を検討する必要がある。

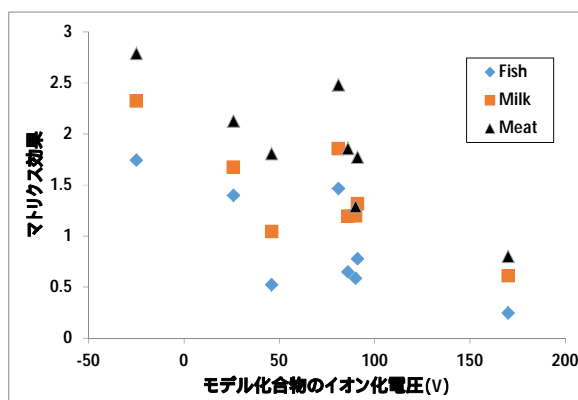


図2 モデル化合物のマトリクス効果 (ベースラインのシグナル強度を 1 とした相対値) とイオン化電圧の関係

(参考文献)

[1] Adusumilli R., Mallick P. (2017) Data Conversion with ProteoWizard msConvert. In: Comai L., Katz J., Mallick P. (eds) Proteomics. Methods in Molecular Biology, vol 1550. Humana Press, New York, NY

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Asakawa Daichi、Uemura Masako、Sakiyama Takanori、Yamano Testuo、Sensitivity enhancement of aminoglycosides in hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry by post-column addition of trace sodium acetate in methanol、Food Additives & Contaminants: Part A、査読あり、Vol. 35、2018、pp. 1116-1126

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。