

卷頭言

分析化学イノベーション2025—社会の中の計測技術

Analytical Chemistry Innovation 2025—Analytical Technology in Public

(社)国際環境研究協会・
プログラムオフィサー

原口 純彦



「イノベーション(innovation)」を辞書で引くと、「革新、改革、新しいもの」という意味である。我が国では2006年9月安部内閣発足時に、「イノベーション2025」計画が発表され、政府が主導する「イノベーション25戦略会議」が組織されて、「2025年までに日本が目指すべきイノベーションの姿」に関する検討がなされた。これを受け、日本学術会議でも「科学者コミュニティが描く未来の社会」がまとめられた。このような動きは、総合科学技術会議、経済財政諮問会議など、我が国の政策決定に大きな影響力をもつ組織・機関においても、戦略的な政策目標の検討が科学技術・社会システムのロードマップを描くことによって推進されている。一般に私達は「イノベーション」というと、単に技術革新と考えがちであるが、現在のイノベーションは、社会に貢献できる科学技術、生活者(市民)の視点に立つ製品開発、安全・安心な社会の創造、というように、科学者・技術者の自己満足だけの技術革新を目指すものでないことに十分留意しておかなければならぬ。このようなイノベーションの志向は2004年12月米国で発表された国家イノベーション戦略報告“Innovative America”に端を発するもので、

欧州諸国も追随しているので、科学技術立国を標榜する日本に取っては、将来的な社会経済システムを考える上でも、極めて重要な検討課題である。さらに留意すべき点は、現在検討されているイノベーションの動向は、科学技術を基盤とする社会および市民生活の変革であり、持続可能な未来社会の創造を志向していることである。

さて、このような動きに対して、分析化学分野はどうのように対応しているかをご紹介したい。筆者は平成17年度(社)日本分析化学会・会長を務めた。また、日本学術会議でも連携会員として同会議の化学委員会分析化学分科会に所属している。そこで、平成17年9月開催された(財)日本分析工業会主催の分析機器展(幕張メッセ)において、同工業会と日本分析化学会が共催している東京コンファレンスで、「日本学術会議シンポジウム“イノベーションをよぶ分析技術”」を企画した。そのプログラムを次に紹介しておく。(独)科学技術振興機構・理事長(現在)の北沢宏一氏の他に、分析機器メーカー・トップの方々にも講演をいただき、分析・計測技術のイノベーションの動向と展望が語られ、有意義なシンポジウムであった。

CONTENTS

■卷頭言

- ・分析化学イノベーション2025—社会の中の計測技術 原口純彦1

■報文

- ・脳科学における質量分析法を用いた微量物質解析 鍋谷卓司／平林義雄3

- ・食品の安心・安全—食品リスク物質—曾根原仁8

■解説

- ・超高速液体クロマトグラフシステム LaChromUltraにおける分析法の移行技法 伊藤正人／豊崎耕作／清水克敏／鈴木孝明／福田真人13

・液体クロマトグラフ質量分析計

NanoFrontier eLD

- 照井 康／大和田章／永井伸治／師子鹿司16

・日立「ノビアス」シリーズによる

試料クリーンアップ技術の紹介

- 河原井雅子19

■学会発表ミニファイル23

■液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)

アプリケーションノート27

■テクニカルデータ発行ミニファイル28

■新製品紹介

- ・液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier eLD30

・超高速液体クロマトグラフ

- LaChromUltraシステムの
アクセサリおよびカラムラインナップを強化30

・U-3900形拡張試料室の紹介31

- ・マルチグレーティングマイクロプレートリーダーがハイエンドクラスのTOPをめざします。31

■ご挨拶32

- 【日本学術会議シンポジウム“イノベーションをよぶ分析技術”】プログラム
- ・開会の辞：沢田嗣郎(日本学術会議化学委員会分析分科会委員長)
 - ・イノベーションにおける新しい動向：北沢宏一(独)科学技術振興機構理事・日本学術会議会員)
 - ・「パワー&スピード」イノベーションを生むためのグローバル展開：堀場 厚((株)堀場製作所代表取締役社長)
 - ・見えないものを見るようにする：梅沢喜夫(東京大学名誉教授・日本学術会議連携会員)
 - ・イノベーションと分析・計測技術の果たす役割：服部重彦((株)島津製作所代表取締役社長)
 - ・電子顕微鏡によるイノベーション：原田嘉晏(日本電子(株)代表取締役社長兼COO)
 - ・放射光機能解析の最前線－Spring-8で：壽榮松宏仁(理化学研究所播磨研究所所長)
 - ・分析受託サービスと分析技術開発：石田英之((株)東レリサーチセンター代表取締役副社長・日本学術会議連携会員)
 - ・計測・解析のための革新的科学技術：小泉英明((株)日立製作所フェロー・日本学術会議連携会員)
 - ・閉会の辞：原口紘(社)日本分析化学会会長・日本学術会議連携会員)

さらに、本年3月には、日本化学会第88年会・特別企画シンポジウムとして本稿の標題と同じ「分析化学イノベーション2025」が、日本学術会議・日本化学会(分析化学ディビジョン)共催として開催された。これらのプログラムの紹介は割愛するが、文部科学省・科学技術振興機構で推進されている国家プロジェクトである「先端分析機器・計測技術開発事業」のリーダーである二瓶好正教授(東京理科大)ほか8名の先生方が2025年に向けての分析・計測技術開発への指針と夢を語られた。また、本シンポジウムの企画を担当された鈴木孝治教授(慶應大)からは、経済産業省の産業技術中長期計画策定の中で検討された分析・計測技術のロードマップの紹介がなされた。

上記の「分析化学イノベーション2025」シンポジウムにおいて、筆者は「研究領域開拓：メタロミクス研究」という演題で講演の機会を得た。「メタロミクス(metallomics)」とは、2004年に筆者が提唱した新学問領域「生体金属支援機能科学」であり、現在世界的にも注目される研究領域となりつつある。このメタロミクスの基本概念は、「地球上の人間、動物、植物を含むすべての物質には周期表中のすべての元素が含まれる」とする「拡張元素普存説」と、その究極の研究目標である「生物細胞1個にもすべての元素が存在す

る」とする「細胞小宇宙説」である。このような生命科学における新しい概念の提唱は、1980年以降発展してきたICP-AES(誘導結合プラズマ発光分析法)とICP-MS(誘導結合プラズマ質量分析法)による高感度・多元素同時分析法の発展を基盤とする「全元素分析」を志向する研究の成果によって可能になったものである。このメタロミクス研究においては、微量金属元素の化学形態別分析法(chemical speciation)の開発と、生体金属の機能の解明が今後の最重要課題である。その結果は、医学診断や病態解析への応用、無機医薬品開発(創薬)、環境科学・健康科学の新展開等の多方面の研究の発展に寄与することが期待される。メタロミクスの提唱は、分析・計測技術の進歩が新学問領域の開拓に繋がった一例であり、今後ゲノミクス(遺伝子科学)、プロテオミクス(タンパク質科学)と連携することで、生命科学、医学、薬学、環境科学の更なる進歩に貢献できると確信している。

先に紹介した「先端分析機器・計測技術開発事業」において推進されている研究課題のほぼ半分は医療診断技術開発に関連したものである。分析・計測技術は新機能性材料や産業製品の開発においても基盤技術となるものである。さらに今後は、地球環境、エネルギー、資源、食料に関連する問題の解決が、地球上での人類の生存に係わる喫緊の課題となっている。これらの課題は、「人間と科学技術と自然の共生」を実現する緊急かつ重要な命題である。そこで、グローバルな人間生存に係わる研究課題に対しても貢献ができる分析・計測技術の研究戦略・開発戦術の構築が求められる。このような問題解決と未来社会創造に貢献できる分析・計測技術は、「社会の中の計測技術」としてイノベーションの推進力となり、大きな社会的役割を担うことになる。著者は、分析化学・計測技術の分野に、そういう時代が来るることを切に願っている。分析機器メーカーにも、そのような役割と貢献を期待したい。

著者略歴

原口 紘(はらぐち ひろき)
昭和18年生まれ
昭和41年 東京大学理学部化学科卒
昭和43年 東京大学大学院理学系研究科修士課程修了
昭和44年 東京大学大学院理学系研究科博士課程中途退学
昭和44年 東京大学農学部助手
昭和49年 国立公害研究所研究員
昭和53年 東京大学理学部助教授
昭和63年 名古屋大学工学部教授
平成9年 名古屋大学大学院工学研究科教授
平成17年 名古屋大学定年退職(名誉教授)
平成17年 (社)日本分析化学会会長
平成17年 (社)国際環境研究協会・プログラムオフィサー(現在に至る)

U.D.C.543.51 : 611.81 : 543.063 : 546.185_325 : 543.07

脳科学における質量分析法を用いた微量物質解析

Analysis of minor components in brain samples by mass spectrometry: application to neuroscience

鍋谷 卓司* 平林 義雄*



鍋谷 卓司



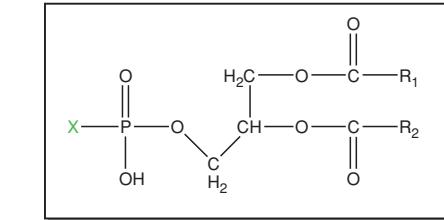
平林 義雄

1. はじめに

質量分析計の飛躍的な発展に伴い、脳科学研究分野においても年々その需要が高まっている。当センターにおいても複数の質量分析計を備え、日々高い稼働率を誇っている。脳内生理活性物質は多種多様であり、それぞれに適した検出法の開発は必須である。我々は中枢神経系における新たな生理活性脂質としてホスファチジルグルコシド(PtdGlc)を見出し、その微量検出および定量法として順相ナノLC-MS/MSを用いた手法を確立している¹⁾。また、当研究所研究者の需要を考えて、細胞内シグナル伝達の重要な制御機構である蛋白質の可逆的リン酸化をMS分析する方法の開発に着手している。今回、新たに電子捕獲解離(electron capture dissociation: ECD)を用いることにより、リン酸化プロテオーム解析する手法を確立した。以下にそれぞれの方法の詳細について述べる。

2. 生体膜脂質PtdGlcの解析

細胞膜を構成する多種多様の脂質は細胞の情報伝達に重要な役割を担っている。例えば、スフィンゴ脂質は膜マイクロドメインの一種である脂質ラフトの主成分であり、受容体などの機能性分子を集合させシグナル伝達の足場を形成していると考えられている。我々はグリセロリン脂質の一種であるPtdGlcもまた脂質ラフトに局在することを見出した²⁾。PtdGlcは最近発見された新規の脂質である。分子内にグルコースを有し、リン脂質でもあり糖脂質でもあるというユニークな膜脂質である³⁾。PtdGlcは分子構造的には単純であり、一般的に知られているリン脂質であるホスファチジルイノシトール(PI)と良く似た構造をしている(図1)。しかし、その存在量が少ないため、近年まで見逃されてきたと考えられている。長塚らによる最近の研究の結果、PtdGlcはHL60細胞の顆粒球への分化や²⁾、発達期げっ歯類脳におけるアストロサイトへの分化に関与していることがわかつてき⁴⁾。また、PtdGlcはホスホリパーゼA2により加水分解を受け、水溶性のリゾホスファチジルグルコシド(lyo-PtdGlc)に容易に分解される⁵⁾。リゾリン脂質は脂質メティエーターとして注目されておりlyso-PtdGlcも情報伝達物質として重要な機能を持つと考えられている。



X=—OCH₂CH₂N(CH₃)₃ : ホスファチジルコリン(PC)
X=—OCH₂CH₂NH₂ : ホスファチジルエタノールアミン(PE)
X=—OCH₂CH(OH)CH₂OH : ホスファチジルグリセロール(PG)

: ホスファチジルイノシトール(PI)
 : ホスファチジルグルコシド(PtdGlc)

図1 グリセロリン脂質の分子構造

生体膜脂質は、物理的・化学的性質が大きく異なった分子により構成されているので、一度に全脂質を分析することは不可能に近い。一般的に生体試料中の脂質成分の分析は溶媒抽出法や各種クロマトグラフィーを組み合わせて各脂質成分を分離精製して行われる。また、目的物が微量成分の場合、大量の試料を用い、複数の分離法を組み合わせ部分精製後検出しなければならない。我々は脂質混合物中の微量成分であるPtdGlcを直接的に検出・定量する方法として順相ナノLC-MS/MSを用いた手法を開発した。この方法を用い、ラットC6グリオーマ細胞中のPtdGlcを解析した例を紹介する。

2.1 PtdGlcの検出

我々はまず標準試料として精製品のPtdGlcをその他

* 理化学研究所・脳科学総合研究センター
神経代謝機構研究グループ 平林研究ユニット

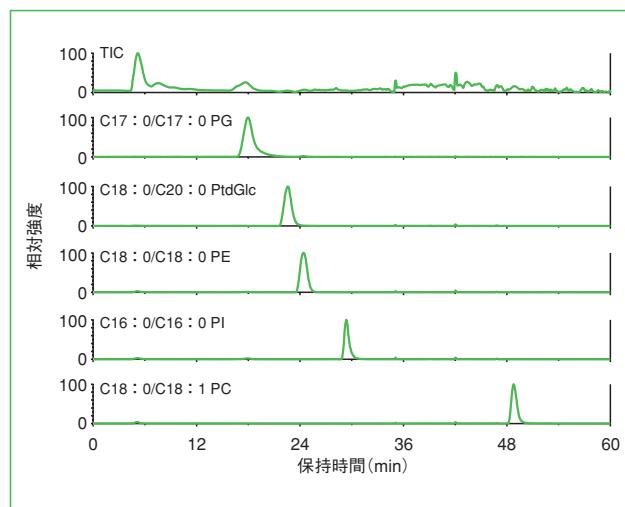


図2 主要リン脂質混合物(それぞれ1μM)のtotal ion current chromatogramとextracted ion current chromatogram

の脂質混合物に加えたものを順相シリカカラムで分離した。分離条件は溶媒A(クロロホルム:メタノール:2-プロパノール:水=80:12.5:7:0.5 in 5 mmol/L 酢酸アンモニウム, pH7.5)と溶媒B(メタノール:2-プロパノール:水=92.5:7:0.5 in 5 mmol/L 酢酸アンモニウム, pH7.5)の2液を用い, 100%溶媒Aから30分で70%溶媒Bに連続的に組成を変え, 10分70%溶媒Bで固定し行った。本条件によりPtdGlcとその他の主なリン脂質を良好に分離することができた(図2)。以前, 報告された方法ではPtdGlcとホスファチジルグリセロール(PG)はほぼ同じ保持時間であったが⁶, 溶媒に少量の水を加えることにより, PtdGlcとPGを明確に分離することができた。また, 順相クロマトグラフィーはリン脂質の種類で分離が可能であり, それぞれ似た構造を持つPtdGlcとPIを明確に分離することができた。

2.2 PtdGlcの定量

質量分析法を用いた化合物の定量は安定同位体ラベルを用いることで正確に行うことができる。しかしながら, PtdGlcに安定同位体ラベルを用いることは困難である。そこで, 我々は天然に存在せず, 順相クロマトグラフィーでPtdGlcと保持時間が近く, 容易に入手可能な1, 2-ジヘプタデカノイル-3-ホスファチジルグリセロール(C17:0/C17:0 PG)を内部標準とし定量解析を行った。本実験条件において, PtdGlcの検出感度は1fmolで, 定量解析は6.3から800fmolの間で可能であることがわかった(相関係数, R2>0.995:図3)。

2.3 ラットC6グリオーマ細胞中のPtdGlcの定量解析

我々はPtdGlcが発達期脳のラジアルグリア/アストロサイトにおける新規細胞表面マーカーであることを見出した²。C6グリオーマ細胞はcAMP/テオフィリンでアストロサイトへ分化誘導が可能なため, 神経細胞

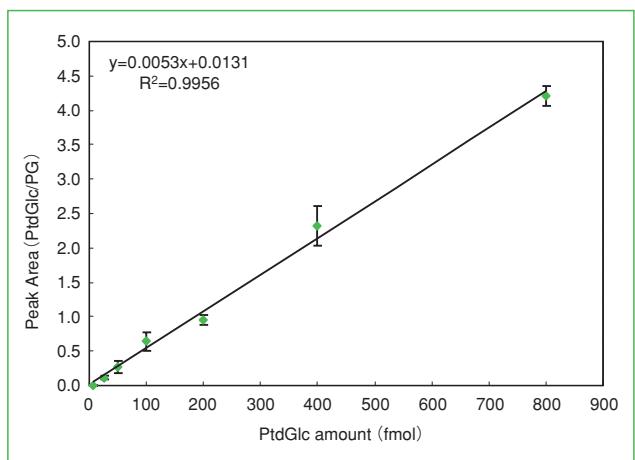


図3 PtdGlcの定量曲線

表1 C6グリオーマ細胞中のPtdGlcの定量結果

Culture conditions	Amount of PtdGlc ^a (nmol/10 ⁶ cells)
10% FBS(control)	N.D. ^b
Serum-free medium	0.51±0.16
cAMP	N.D. ^b
DIM21	0.51±0.14
DIM21+cAMP	4.61±0.11

^aMean±SD; n=3.

^bN.D.; Not Detected

のラジアルグリア/アストロサイトへの分化における分子機序の研究においてモデル細胞として使用されている。また, 我々はC6グリオーマ細胞をPtdGlcモノクローナル抗体(DIM21)で処理するとアストロサイトで発現するGFAP蛋白質が増加することを見出した。そこで, 我々はグリア細胞におけるPtdGlcの役割のさらなる研究のため, C6グリオーマ細胞の分化におけるPtdGlcの変動を順相ナノLC-MS/MSを用いた方法で検証した。

試料調製として, 10%ウシ胎児血清(FBS)を含む培地で培養したC6グリオーマ細胞に対し, 血清除去で1時間培養後, 10μg/mLのDIM21および, 1mM cAMP/0.25mMテオフィリンを加え2日培養した細胞を用いて測定を行った。試料は通常培養した細胞(10%FBS), 血清除去した細胞(Serum-free medium), cAMP/テオフィリン処理のもの(cAMP), DIM21処理のもの(DIM21), それとcAMP/テオフィリン処理に加えDIM21処理のもの(DIM21+cAMP)の5つを比較した。PtdGlcの定量解析した結果を表1に示す。C6グリオーマ細胞中のPtdGlcはDIM21+cAMP処理の条件下で顕著に増加していることがわかった。この結果は薄層クロマトグラフィーと免疫染色を用いた解析結果と一致した。

以前, 我々はHL60細胞においてDIM21処理によりPtdGlcの増加とともに顆粒球への分化が起こることを見出したが², 今回の結果は, C6グリオーマ細胞においてPtdGlcがアストログリア分化に関与するシグナル

伝達ドメインもしくは脂質ラフトを形成していることを示唆していた。また, 今回測定したC6グリオーマ細胞中のPtdGlcからは, 不飽和脂肪酸は検出されず, 炭素数18および20の飽和脂肪酸のみを有した単一成分のみ検出された。この結果は, PtdGlcがリン脂質でありながらラフト様マイクロドメインに存在する理由にもなる。なぜなら, マイクロドメインの主要成分であるスフィンゴ脂質は飽和脂肪酸を主成分としており, コレステロールと共にliquid ordered phaseを形成していると考えられるからである。

以上に記載した方法で, 脂質混合物中の微量成分であるPtdGlcを検出・定量する事が可能となった。現在までのところ, 検出されたPtdGlcは全てC18:0およびC20:0の単一の脂肪酸組成を有していることから, 生体は高度に制御されたPtdGlc生合成系を持ち, 従って重要な生物学的機能を有していると想像された。

3. 電子捕獲解離を用いたリン酸化プロテオーム解析

蛋白質の可逆的リン酸化は代表的な翻訳後修飾の一つであり, 細胞内シグナル伝達や蛋白質複合体形成および蛋白質局在の制御等, 様々な細胞過程に重要な役割を担う制御機構である。ある時点での細胞内蛋白質の約30%はリン酸化されていると見積もられている。また, ヒトプロテオームにおいてリン酸化を受ける可能性のある部位は100,000以上存在すると試算されており, その詳細な機能および動態は不明なのが多く残されている。また, 異常なリン酸化は様々な疾病を引き起こすため, その制御機構の解明および詳細な修飾部位の解析は, 生物学的現象の理解だけでなく創薬の観点からも極めて重要である。

質量分析法を用いたリン酸化プロテオーム解析は1度の解析で複雑なリン酸化の現象を包括的に解析できる手法である。しかし, リン酸化体の割合が低く, かつ, リン酸基のイオン化抑制効果等により, リン酸化ペプチドの測定は容易ではない。従って質量分析に賦す前にリン酸化ペプチドをあらかじめ精製しておかなければならぬ。また, 従来から知られている質量分析法として, 分子を解離させその生成イオンを検出するタンデム質量分析法(MS/MS)が有効ではあるが, リン酸化ペプチドの測定においては, 不安定なリン酸基の影響により解離が不十分になる場合が多い。MS/MSでの問題を克服する新しい解離法として1998年にZubarevらが電子捕獲解離(electron capture dissociation: ECD)を報告した⁷。その後の開発によりECD法は普及型の質量分析計である高周波イオントラップ型での使用が可能になり, 簡便な測定が可能になった⁸。我々は有用なリン酸化プロテオーム解析構築のため, リン酸化ペプチド精製法の検討およびECD法を用いた測定の検証を行った。

表2 リン酸化ペプチド精製法の比較

	IMAC(Fe)	TiO ₂	Phos-tag
リン酸化ペプチド	0	5	8
未修飾ペプチド	0	8	0

試料: ウシ血清アルブミン, 卵白アルブミン, α -カゼイン混合物のトリプシン消化物, 400 fmol
Phos-tagは微量試料の回収率および精製効率が高かった。

表3 CID, ECDによる解析結果

	同定蛋白質数	リン酸化蛋白質	ペプチド数	リン酸化ペプチド
CID	96	37	205	50
ECD	12(3)	4(2)	18(5)	5(2)

括弧内の数字はECD法でのみ同定されたもの

3.1 リン酸化ペプチド精製法の検討

今まで, 様々なリン酸化ペプチド精製法が報告されている。しかし, 実際のところ微量解析に適応できる方法は多くない。我々は複数の手法を比較し, 微量解析に適応しうる高回収率の方法を検証した。その結果, Zn(II)を用いた固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)であるPhos-tag(MANAC Incorporated)を用いた方法が最も回収率が高かった。さらに, その方法において, 試料吸着および洗浄過程に65%アセトニトリルを使用することで精製効率を向上させることができた。Fe(III)を用いたIMACとチタニア(TiO₂)を用いた方法および改良後のPhos-tagを用いた3種類の方法の結果を表2に示した。試料はウシ血清アルブミンとリン酸化蛋白質である卵白アルブミンおよび α -カゼインの混合物のトリプシン消化物を用いた。Phos-tagを用いた方法は高回収率で精製効率も高いことがわかる。

3.2 ECD法を用いたリン酸化プロテオーム解析

リン酸化プロテオーム解析におけるECD法の有効性を検証するため, 一般的に用いられる衝突誘起解離(collision-induced dissociation: CID)法およびECD法を用いた測定を同時にを行い, 両者の結果を比較検討した。試料はHEK293細胞より抽出した蛋白質混合物をトリプシン消化後, Phos-tagでリン酸化ペプチドを精製し使用した。装置はECDが可能なNanoFrontier LD(カラム: 逆相C18)を用いた。CIDおよびECDを用いたそれぞれの測定結果を表3に示した。同定数で比較するとECD法はCID法に見劣りする結果であった。その原因はECD法の反応効率にあると思われ, その効率は検出ペプチド数からCIDの1割程度と思われる。しかし, 結果の内容を見たところ, ECDの測定でのみ同定できた蛋白質が観察された。図4に同じプリカ

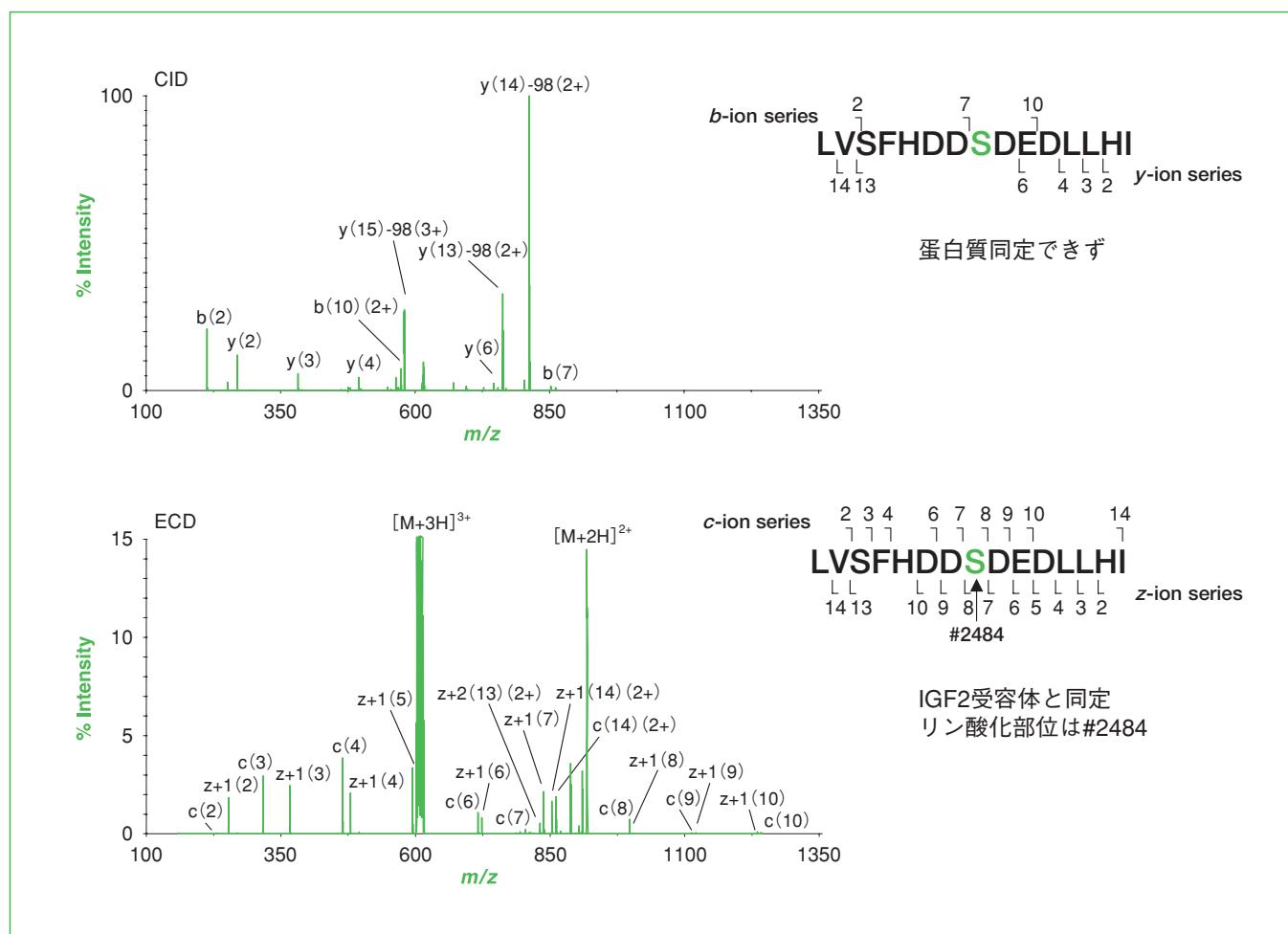


図4 CID, ECDのマススペクトルの比較

表4 CIDとECDの2つの分析結果を組み合わせた解析結果

同定 蛋白質数	リン酸化 蛋白質	ペプチド数	リン酸化 ペプチド
CID+ECD	107	50	271

ーサーイオン(m/z 612.3)から得られたCIDおよびECDのマススペクトルを示した。CIDの測定ではリン酸脱離由来のピークが優先し、情報量が少なく蛋白質同定できなかった。一方、ECDの測定ではペプチド骨格由来のピークが多数得られ、蛋白質はIGF2受容体で、リン酸化部位は2484番目のセリンであることを決定できた。この結果はECD測定の有用性を示していた。

CIDおよびECDよりそれぞれ得られる結果は相補的であり、2つの結果を組み合わせることは極めて有効であると考えられた。今回得られた2つのデータを足し合わせて1つのデータとし蛋白質同定を行った。データベース検索の検索条件としてCIDおよびECDの両方の条件(プロダクトイオン: b , y , c , z シリーズ)を考慮し行った。その結果を表4に示した。表3と表4を比較すると単純にCID測定の結果とECD測定の結果を足し合わせたものでないことがわかる。1つの測定

では信頼性が低い結果が、質の異なる2つのデータを合わせることで信頼性が格段に向上したことを示していた。

翻訳後修飾の解析は蛋白質同定に比べ、情報量が多く質の高いデータが必要である。今回、従来のCIDの測定にECDの測定を加えることで、すなわち質の異なるデータを重ね合わせることにより、結果の信頼性向上が得られた。ECDを搭載したNanoFrontier LDは信頼性の高いデータを与える、リン酸化プロテオーム解析において大変有効であると考えられる。

4. 終わりに

今回、ナノLC-MS/MSを用いた微量脂質とリン酸化プロテオームの解析について述べた。質量分析法は微量物質の解析に適しているが、検出の前段階である試料調製および分離条件が極めて重要である。今回述べた2つの手法は同じ質量分析計で検出しているが、試料調製やLCの条件は全く異なる。実際の微量物質の解析のためには、目標物に適した解析システムの構築が重要である。研究ターゲット分子の化学的、物理的な知識はもちろんのこと、分離精製の経験が必要とされる。

参考文献

- 1) S. Ito, T. Nabetani, Y. Shinoda, Y. Nagatsuka, and Y. Hirabayashi, Quantitative analysis of a novel glucosylated phospholipid by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 376(2008) 252-7.
- 2) Y. Nagatsuka, M. Hara-Yokoyama, T. Kasama, M. Takekoshi, F. Maeda, S. Ihara, S. Fujiwara, E. Ohshima, K. Ishii, T. Kobayashi, K. Shimizu, and Y. Hirabayashi, Carbohydrate-dependent signaling from the phosphatidylglucoside-based microdomain induces granulocytic differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(2003) 7454-9.
- 3) Y. Nagatsuka, T. Kasama, Y. Ohashi, J. Uzawa, Y. Ono, K. Shimizu, and Y. Hirabayashi, A new phosphoglycerolipid, 'phosphatidylglucose', found in human cord red cells by multi-reactive monoclonal anti-i cold agglutinin, mAb GL-1/GL-2. *FEBS Lett* 497(2001) 141-7.
- 4) Y. Nagatsuka, Y. Horibata, Y. Yamazaki, M. Kinoshita, Y. Shinoda, T. Hashikawa, H. Koshino, T. Nakamura, and Y. Hirabayashi, Phosphatidylglucoside exists as a single molecular species with saturated fatty acyl chains in developing astroglial membranes. *Biochemistry* 45(2006) 8742-50.
- 5) Y. Horibata, Y. Nagatsuka, P. Greimel, Y. Ito, and Y. Hirabayashi, Sensitivity of phosphatidylglucoside against phospholipases. *Anal Biochem* 365(2007) 149-51.
- 6) Y. Nagatsuka, H. Tojo, and Y. Hirabayashi, Identification and analysis of novel glycolipids in vertebrate brains by HPLC/mass spectrometry. *Methods Enzymol* 417(2006) 155-67.
- 7) R.A. Zubarev, N.L. Kelleher, and F.W. McLafferty, Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process. *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 3265-3266.
- 8) T. Baba, Y. Hashimoto, H. Hasegawa, A. Hirabayashi, and I. Waki, Electron Capture Dissociation in a Radio Frequency Ion Trap. *Anal. Chem.* 76(2004) 4263-4266.

U.D.C.641.1/3 : 614.31.615.372 : 536.49 : 632.95 : 632.95 : 637.131.8 : 579.63

食品安全・安全 — 食品リスク物質 —

Safety and Reassurance of Foods — Food risk materials —

1. はじめに

今年1月に発生した冷凍餃子中毒問題は、食品に混入した殺虫剤成分による健康被害の発生という強烈なインパクトのため、報道関係で取り上げられる機会が多く、食の安心・安全に対する一般消費者の関心を高める結果となった。最近も相次ぐ食肉やうなぎ等の産地偽装事件とともに、昨今、食品企業側の安心・安全保証に関する姿勢がより一層問われている。

「食の安心・安全」に関しては食品企業として取り組むべきテーマが多数挙げられるが、重要と考えられるものの一つに「食品リスク物質に関する分析体制の整備」がある。食品リスク物質に関して、日常どのような考え方の下で検査を行い、緊急時には迅速な分析対応が可能であるかという点が、お客様に対する企業の姿勢をアピールするポイントの一つにもなり得るからである。今回はこの食品リスク物質及びこれらの分析体制整備に向けた考え方等を簡単に紹介する。

2. 食品リスク物質の種類

食品リスク物質は一般的に「食品危害物質」や「食品有害物質」と記載されることが多い。これらは主に「それを含有する食品を摂取することにより、短期・長期的に何らかの健康被害が生じる可能性がある物質」と解釈される。ただし健康被害リスクが小さい物質もあるため、本稿では「食品リスク物質」という表現で統一したい。食品企業として対応が必要と考えられる主なものについて下記に記載する。

①微生物

汚染菌または雑菌。その食品の特性維持に貢献する微生物、例えは納豆における納豆菌のようなものを除き、最終製品中で増殖する可能性のある微生物は、食品の腐敗・変敗または食中毒を引き起こす危険性がある。この中でも特に食中毒菌については、急性の健康被害原因となり人を死に至らしめる場合もある。耐熱性芽胞を有する*Clostridium*属や、耐熱性毒素を生産する*Bacillus cereus*などは制御の難易度が比較的高く¹⁾、危害物質としてのリスクが大きい。

* 味の素株式会社 食品技術開発センター 食品解析グループ長

②残留農薬

農薬は、害虫や雑草などの駆除、作物の生理機能の抑制などを目的として散布されるがたゞちに消失するわけではなく、作物に付着した農薬が収穫された農作物に残り、これが直接人の口に入る、または家畜の飼料として利用され、ミルクや食肉を通して人の口に入ることも考えられる。これを「残留農薬」という。2006年5月、ポジティブリスト制が施行され、規制が大幅に強化された。化学構造から有機塩素系、有機リン酸系、カーバメイト系、ピレスロイド系、含窒素系等に分類される²⁾。

③動物用医薬品

家畜飼育時の疾病予防や栄養成分の有効利用の促進・安定供給のため、抗生物質、合成抗菌剤などの動物性医薬品が利用されている。残留する食肉等を摂取することにより薬剤耐性菌の出現や人に対する毒性発現など人の健康への影響が懸念されるため、使用方法は薬事法に定められている。残留農薬同様、食品中に残留する動物用医薬品は、ポジティブリスト制により規制されている。

④アレルゲン

身体には異物(抗原・アレルゲン)に対し抗体を産生し、抗原を排除するシステムがある。この生態防御システムが、過剰に反応しておこるのがアレルギーである。アレルギーにはI型～IV型があり、食物アレルギーはI型アレルギーに分類される。

I型アレルギーは、アレルゲンの侵入によって多量に産生されたIgE抗体が、再びアレルゲンが侵入することで抗原抗体反応をおこし、マスト細胞からヒスタミンなどの化学物質が産生されて起こる。平成14年4月より、加工食品のアレルゲン表示制度が施行された。現在、表示が義務付けられているのは、卵・乳・小麦・そば・落花生・えび・かにの7品目。その他18品目について、表示が推奨されている。

⑤遺伝子組み換え作物(GMO)

GMOとはGenetically Modified Organism(遺伝子組み換え作物)の略称。ある生物から有用な遺伝子を取り出し、他生物の遺伝子に挿入することによって開発さ

曾根原 仁*



曾根原 仁

れた作物。除草剤耐性の大豆や、殺虫毒素を生成するじゃがいもやトウモロコシなどがある。現在、GMOについては、挿入された遺伝子や產生されたたんぱく質が短期的に危害要因にはならないと考えられている。しかし、長期的に摂取することによる人体への影響や、安全性評価の方法、未承認作物混入の危険性などの問題を含んでいる。また、自然交配による生態系の破壊や、標的生物以外への影響など、環境への影響も懸念されている。

⑥トランス型脂肪酸

トランス型不飽和脂肪酸の総称。構造中にトランス型の二重結合を持つ不飽和脂肪酸である。天然植物油にはほとんど含まれず、水素を添加して硬化したマーガリン、ファットスプレッド、ショートニングなど

表1 輸入食品において、違反事例の多い食品添加物

サイクランミン酸	指定外添加物	人工甘味料の一つ。サイクランミン酸ナトリウム(シクラミン酸ナトリウム)またはサイクランミン酸カルシウム(シクラミン酸カルシウム)。1937(昭和12)年にアメリカの科学者Michael Svedaによって発見された。砂糖の約30倍の甘味があり、かつてはサッカリンと共に一大榮華を誇ったものの、発がん性の疑いがある事が分かり1970(昭和45)年に使用禁止になった。しかし後の研究により発がん性の疑いが無いことが明らかとなっている。
二酸化硫黄	指定基準あり	二酸化硫黄は抗菌作用があるため、食品添加物としてアルコール飲料やドライフルーツの保存料、漂白剤、酸化防止剤に使われている。腐敗を防ぐためというより、見た目を保つために用いられることが多い。
ソルビン酸	指定基準あり	ソルビン酸(Sorbic acid)は保存料として使用される不飽和脂肪酸。IUPAC名は2,4-ヘキサジエン酸(2,4-hexadienoic acid)
TBHQ	指定外添加物	油脂類の酸化防止剤。ドーナツ会社が販売した肉まんに使用されていたことが話題となった。
安息香酸	指定基準あり	抗菌作用があるので、水溶性のナトリウム塩、安息香酸ナトリウム(Sodium Benzoate)などは清涼飲料等の保存料として添加されている。旧厚生省は安息香酸を天然に存在しない添加物に分類している。
ポリソルベート	指定外添加物	通称tween。乳化剤、分散剤、洗浄剤などとして、多くの国で広く使用。
亜硝酸銀	指定基準あり	保存料、着色料として使用

⑦マイコトキシン

真菌類が产生するカビ毒の総称。アフラトキシン、オクラトキシン、フザリウムトキシンなど150種類以上存在する。アスペルギルス属のカビが产生するアフラトキシンB1が有名で、強い発癌性が認められているため、食品衛生法によって検査方法が示され、輸入食品では検査が義務づけられている。検査対象は、輸入ナッツ類(ピーナッツ(落花生)、ピーナッツ含有食品、ピスタチオ、アーモンド、クルミ、ジャイアントコーン、ブランジルナッツ)、チリペッパー、レッドペッパー及びこれらを含む香辛料、ナツメグ、ハトムギ等。また、配合飼料にもアフラトキシンB1の暫定基準値(0.01ppm)が設けられている。一部食品では、デオキシニバレノール(DON、小麦)、パツリン(リン

(硬化油)を製造する過程で発生する。多量に摂取するとLDLコレステロール(悪玉コレステロール)を増加させ心臓疾患のリスクを高めるといわれ、2003年以降、トランス脂肪酸を含む製品の使用を規制する国が増えている。

⑧放射線照射食品

殺菌や発芽防止目的として放射線が照射された食品。ばれいしょの発芽防止に放射線を利用したのが発端。ジャガイモ、香辛料等で実用化が進んでいたが、照射の結果生じる「放射線分解生成物」の中には、発がん性や遺伝毒性をもつ成分のあることも疑われている。現段階では放射線照射食品については、食品衛生法第11条に基づき定められる「食品の製造・加工基準、保存基準」において、原則禁止とした上で、ばれいしょに対する放射線照射のみ許可されている。

⑨内分泌搅乱物質(環境ホルモン)

生物の内分泌機能に影響を及ぼす化学物質。環境中の化学物質が、体内に入りホルモンと同じような働き

をしたり、ホルモンの働きを妨害するもの。環境ホルモンは、非常に微量で作用し、体内に蓄積し(生物濃縮)，母親から子供に移行し、次世代に影響する。急性毒性ではなく、成長後に影響が現れるなど、影響が分かりにくく、因果関係の解明が困難である。現在、内分泌搅乱作用が疑われていた65の化学物質は産業化学物質(塗料、樹脂可塑剤等由来アルキルフェノール類・フタル酸化合物)，ダイオキシン、農薬に分類される。また医薬合成ホルモン、天然物質の大豆イソフラボンを環境ホルモンと捉える考え方もある。

⑪自然毒

動物性と植物性に分けられる。統計上、植物毒には

アルカロイド(ジャガイモの毒など)のほかキノコ・カビ毒が含まれる。キノコでは野生のものを採取して調理、中毒のパターンが主で、その原因となるキノコは、カキシメジ、クサウラベニタケ、ツキヨタケの3種類。シメジ、ヒラタケ、シタケとの誤食が多い。野生の乾燥ポルチーニで質の低いものは何種類かの混合の場合があり、混入リスクが考えられる。

⑫その他の物質

食品原料由来の成分等で、健康被害リスクを伴う危険物質。ヒ素・重金属、大豆サポニン、アクリルアミド、ソラニン、3-MCPD等が考えられる(表2)。

表2 その他の危険物質

大豆サポニン	サポニンは泡立つことからシャボンを語源としている。泡立つ物性は親水性と疎水性の構造を持ち、水と油両方に接する界面活性をもつためである。サポニンでは親水性の糖部分と疎水性アグリコンのステロイドあるいはテルペノイド骨格をもつ分子構造をしている。サポニン類は大豆以外の植物、動物から数多く発見されており、種類によって様々な薬理作用、生体への作用・効果があるため、昔から漢方、健康食としてとりいれられてきた。実用されている朝鮮人参の血液凝固阻止、センナの下剤、ナマコの抗水虫などの作用はサポニンである。大豆サポニンは脂質の過酸化の抑制、脂質代謝を促進などの効能がうたわれている。サポニンはその効能の基が上記、界面活性であり、溶血性毒作用にもなり得るので注意が必要である。
	アクリルアミドは、紙力増強剤、合成樹脂、土壤安定剤、接着剤等の原料として用いられており、神経障害を起こしたり、発ガン性があるといわれている。炭水化物を多く含むイモ等を焼いたり揚げたりすると、アクリルアミドが生成されることが分かっている。厚生労働省では、アクリルアミドの毒性評価等の研究をすすめるとともに、消費者に対しては、揚げ物や脂肪食の過度の摂取を控え、バランスの取れた食事を行うように呼びかけている。アクリルアミドが生成し、含まれる食品として、当初の報告では「炭水化物を多く含む食品」との表現だった。その後研究が進みアスパラギンとブドウ糖などが、加熱により反応して、アクリルアミドが生成するということがわかつてきた。油で揚げるなど、高温加熱調理法を知ったときから、人類は食品とともにアクリルアミドを摂ってきたと考えられ、食生活を直ちに見直す必要はないという考え方が国内では一般的。コロッケなどの衣のついた調理、茹で、蒸しでは生成しにくいと考えられている。
ソラニン	ソラニンというグリコアルカロイドに分類される毒成分。水溶性で、苦味・えぐみがある。以下の事実、摂取量、管理・加工法を踏まえ、加工食品での中毒リスクは低いと考えられる。過去、日本では幼児が、ジャガイモの芽だけを2、3個食べて、嘔吐・下痢・痙攣が数日続いた例や、学校で栽培した無駄別の緑化ジャガイモを食べた小学生の集団中毒が報告されている。イモに0.02%重量=200mg/kg含まれるが、芽や緑化した皮に増加している。致死量は成人50kgで200-350mgで、一度に皮付きイモを1kg以上食べないと中毒死しない計算となり、さらに9割が皮周辺に局在することから、皮をむくことで中毒のリスクは十分回避される。①イモの遮光保存管理がなされているか、②芽・緑化した部位・皮の除去がされているか、が一般に注意点として挙げられる。
	3-Chloropropane-1, 2-diol 大麦、大豆、ピーナッツ等に含まれる植物性たんぱく質を塩酸存在下で高温処理すると、acid-HVP(植物たんぱく加水分解物)に変わる。HVPは、醤油、ソースなど各種加工食品に使われている。その生成過程で、たんぱく質の残脂質成分が3-MCPDとなる。動物実験において、発ガン性が示されており、その摂取は最低限にとどめる必要がある。欧州では、中国、タイ、台湾、香港等で生産された醤油やソースなどから、EUの食品安全基準を上回る3-MCPDが検出され問題となった。

3. 食品リスク物質に対する分析体制整備の考え方

1. で述べた通り、我々食品企業は上記項目について日常から検査・分析体制の構築を考える必要がある。これらすべてについていつでも自社内で分析可能な状態を維持することが理想的ではあるが、経営資源(人件費、設備投資)等の観点から現実的には困難な場合が多い。従って食品企業はどの項目の分析技術を保有し、または外部検査機関に分析を委託するか、という判断に迫られている。この判断すなわち分析体制整備の考え方は各企業毎に様々であるが、その一例として、食品リスク物質のリスク評価に基づく手法について紹介する。

STEP 1 食品リスク物質の洗い出し

上記に記載したような物質を選定する。ただし企業が対象とすべき食品リスク物質は、生産する製品、使用原料等により企業毎に事情が変わってくる。その企業において本当に必要な項目をリストアップする必要がある。

STEP 2 リスク評価

各項目をいくつかの観点から評価する。例えば表3の例では健康被害(急性・慢性)、風評(消費者・メディアの関心)、法令違反、食品原料別存在確率の観点からリスク評価を行い総合評価を実施し、この結果に基づいてどのリスク物質にウエイトを置くかを判断している。この例では微生物分析、残留農薬、アレルゲンが高リスク物質として位置づけられている。

表3 リスク評価の例

危害物質名	健康被害リスク			風評(消費者・メディアの関心)		法令違反(国内)			食物別残留リスク	総合評価
	急性	慢性	発生頻度	国内	国外	表示	基準値	違反事例数	存在確率	
食中毒(微生物由来)	○	△	○	○	○	○	○	○	○	A
残留農薬	○	△	○	○	○	○	○	○	○	A
アレルゲン	○	×	△	○	○	○	○	○	○	A
GMO	×	×	△	○	○	○	○	○	○(大豆・トウモロコシ・甜菜等)	B
トランス型脂肪酸	×	国内国外 × ○	△	○	○				○	C
動物用医薬品	○	△	×	△	△	○	○	○	○(魚介類・蓄肉類)	B
食品添加物	×	○	△	○	○	○(一部)	○	○	○	B
マイコトキシン(カビ毒)	×	○	△	○	○	○(一部)	○	○	○(トウモロコシ・ピーナツ等)	B
放射線殺菌	×	△	×	○	○	○	○	○	○(香辛料・ジャガイモ等)	B
BSE	×	○	△	○	○	特定危険部位除去・焼却			○(牛)	B
環境ホルモン	ダイオキシン	×	○	△	○	○			○(魚介類多い)	C
自然毒	麻痺性貝毒	○	△	×	△	○(貝)	△	○(貝)	○(貝)	B
	下痢性貝毒	○	△	×	△	○(貝)	△	○(貝)	○(貝)	B
その他 危害物質	アクリルアミド	×	△	×	○	△			○(一部加工食品)	C
	ヒ素	○	○	×	△	△	○	○	○	B
	鉛	△	○	×	△	△	○	○	○	B
	カドミウム	○	△	×	×	×	○	○	○(米)	C
	3-MCPD	×	○	×	×	△			○(一部加工食品)	C
	1,3-DCP	×	○	×	×	△			○(一部加工食品)	C

※評価基準

■健康被害リスク

- : 重大リスク(死亡・重病)を伴う
- : 摂取量によっては、リスクを伴う
- △: リスクを伴う可能性がある
- ×: リスクをほぼ伴わない

■消費者の関心・認識

- : 重大事故発生に伴い、消費者の関心が非常に高い
- : メディア等・消費者の関心が比較的高い
- △: 一部メディアで報道、一般消費者の関心比較的低い
- ×: 消費者・メディアの関心が低い

■違反事例数

- : 輸入食品等に違反事例多い
- : 違反事例少ないが、話題性が高い

■食品別残留リスク

- : あらゆる製品・原料に残留リスク有
- : 一部製品または原料に残留リスク有

STEP 3 分析体制検討

リスク総合評価の結果により、自社内の定常的分析の実施(技術保有)、外部検査機関への分析依頼体制等を検討・判断する。それぞれで下記のような課題が挙げられる。

自社内:

- ・どの事業所でどの食品リスク物質の分析を担当するか?
- ・どの原料、製品を対象とし、どのような頻度で確認するか?
- ・緊急時の事業所間ネットワークの構築
- ・分析技術の維持(定常的な分析要員の確保)等

外部依頼:

- ・受託検査サービスを実施している外部検査機関の活用法。具体的には食品リスク物質毎に、どの検査機関へ分析を委託するか検討する。
- ・緊急時には同一項目の分析が外部検査機関へ集中することが多く、そのようなケースでもいかに迅速に結果入手できるようにするか。
- ・分析委託費用の計画的予算化 等

分析体制整備の考え方については、上記リスク評価法以外に、過去のクレーム・トラブル事例から自社内分析項目を決定、または保有機器・既存技術から判断する、という考え方もあり、各企業が状況に応じて自社の分析体制整備に取り組んでいる。

4. おわりに

食品リスク物質に関しては今回列挙したもののみに限らず、各企業毎に対象を考慮し対策を進めている。いずれの項目についても「迅速に、かつ信頼できる検査・分析結果を提示可能であること」が重要であり、お客様満足の点でも有効であることは間違いない。例えば残留農薬では「圃場管理」が最も重要な対策ではあるが、いざという時、いくら徹底した圃場管理を説明しても最終製品の分析値が伴わないとお客様に納得していただけないケースがある。企業側の理論ではなく、お客様視点に立った検査・分析の実施、そしてそれを消費者に伝える努力がこれからも企業側に要求されると考えられる。

参考文献

- 1) 清水潮ら編、食品危害微生物ハンドブック、サイエンスフォーラム、p220-229(1998)
- 2) 氏家隆、藤井雄二、雨宮純子、陣内知子、金谷健一郎、食品と開発、Vol.39 No.4, p6-8(2004)
- 3) TOXICOLOGICAL SCIENCES: 53, 33-39(2000)
- 4) 後藤哲久、食品と開発、Vol.39 No.4, p11-13(2004)

超高速液体クロマトグラフシステム LaChromUltraにおける分析法の移行技法

Analytical Method Transfer on LaChromUltra, Ultra High-Speed Liquid Chromatograph System

伊藤 正人* 豊崎 耕作* 清水 克敏* 鈴木 孝明* 福田 真人*

1. はじめに

最近、食の安全に対する意識がますます高まってきて輸入野菜や魚・肉類だけではなく冷凍加工食品なども有害物質を分析する必要があると考えられている。液体クロマトグラフィはこのような食品中の農薬や添加物質をはじめ各種多様な化学物質を溶液の状態で濃度を測定する分析方法である。構造が類似の化学物質群であってもカラムという分離機能材料を用いて精密に分離することができるため、液体クロマトグラフィはライフサイエンスのような基礎研究から製薬、食品、化学、環境分野などに関連する物質の応用分析まで広く利用されている。

2. 分析法の移行技法の基本的な考え方

日立では超高速液体クロマトグラフシステム LaChromUltraを販売してそろそろ2年目を迎える^{1,3)}。当初から汎用液体クロマトグラフィのカラムを使用している分析法から、どのように超高速液体クロマトグラフィ用カラムを用いる分析法に移行するかを示す必要があった⁴⁾。ここでは汎用分析用カラム(内径4.6mm、長さ150mm、粒径5μm)から超高速分析用カラム(内径2.0mm、長さ50mm、粒径2μm)を例題にして分析法の移行方法を簡単に解説する(図1)。

(1) 線速度一定とする第一ステップ

何か一定とするものを基準にできれば、汎用分析用カラムから超高速分析用カラムへ分析法を一義的に移行できる。そこで算数の「道のり=速さ×時間」を思い出してほしい。液体クロマトグラフィではちょうどカラムの長さが「道のり」に、線速度が「速さ」に、ボイド時間(保持されない溶質のカラム通過時間)が「時間」に対応する。吸着しないサンプル溶質がカラムの中を一定の線速度で流れていくため、カラムが長くなれば長くなるほど、それに比例してカラムから出てくる時間がかかる。このため線速度を基準とすれば、つまり線速度を一定とすれば、例題の場合、超高速分析用カラム(長さ50mm)は汎用分析用カラム(長さ150mm)の1/3倍の時間しかかかることがわかる。つまりカラムを短くすることは第一の高速化手法

線速度一定に基づく流量

$$F_1 = \left(\frac{D_1}{D_0} \right)^2 \times F_0 \quad \frac{u_0}{\epsilon} = \frac{u_1}{\epsilon} = \text{const}$$

線速度(倍率)ファクタ f の求め方

$$F = f \times F_0 \quad f = \frac{u}{u_0} = \frac{0.8 \times P_{\text{lim}}}{P_1}$$

移行後(線速度一定)の推定圧力

$$P_1 = P_0 \times \left(\frac{D_0}{D_1} \right)^2 \times \frac{F_1}{F_0} \times \frac{L_1}{L_0} \times \left(\frac{d_0}{d_1} \right)^2$$

グラジェント溶出法のタイムプログラム

$$\left(T + \frac{V_1}{F} \right) = \left(T_0 + \frac{V_0}{F_0} \right) \times \frac{1}{f} \times \frac{L_1}{L_0}$$

図1 分析法の移行技法に関する関係式群
添え字0はオリジナルの分析法を、添え字1は移行後(線速度一定)の分析法を示す。添え字のないものは移行前後で変化のないもの、または移行最終状態(線速度ファクタ f 作用後)を示す。
各パラメータは流量F、カラム直徑D、線速度u、線速度(倍率)ファクタ f、空隙率ε、圧力P、圧力リミットP_{lim}、カラム長L、充填剤粒径d、デュエルボリュームV、プログラムタイムTを示す。

であることがわかる。

線速度一定を維持するとは、内径の断面積が1/5倍になれば、流量もそれに比例させ1/5倍にすることである。つまり流量1mL/minの内径4.6mmのカラムと同じ線速度にするためには、内径2.0mmのカラムは約0.2mL/minの流量にすることになる。実際はカラムの中の充填剤部分には移動相が流れないので空隙率を考慮しなければならないはずだが、同質の充填剤であれば粒径が異なっても空隙率はほぼ一定なのでカラムの断面積を考慮するだけで良い。

(2) 線速度を上昇する第二ステップ

第二の高速化手法として線速度を上昇することができる。例題では汎用分析用カラムの流量1mL/minが、超高速分析用カラムの流量0.2mL/minの線速度と同じであった。超高速分析用カラムで流量0.2mL/minから

* 株式会社日立ハイテクノロジーズ

5倍の流量 1mL/minへ引き上げられれば、線速度が5倍(線速度ファクタ $f = 5$)となり「道のり = 速さ × 時間」の関係からボイド時間(t_0)はさらに1/5倍に短縮できる。第一の高速化手法と組み合わせて、つまりカラム長を縮めてかつ線速度を上昇させることにより、超高速分析用カラムでは $1/3 \times 1/5 = 1/15$ 倍の時間に短縮することができるわけである。

(3) 線速度上昇を制限する圧力上限

ところが線速度は任意に上昇できるわけではない。カラムの圧力上限が線速度上昇を制限する。汎用分析用カラムの分析圧力が既知であれば、超高速分析用カラムの圧力を予測できる。それは圧力がカラム長に、そして線速度に比例する性質があるからである。線速度に比例するということは、流量に比例しカラム断面積に反比例するということである。また、圧力は充填剤の粒径の二乗に反比例すると言われている。これは、圧力が充填剤の接液表面積に比例し上昇する性質があるためである。ここでは分析法移行の前後で移動相の粘度やカラム温度は同じであるとしておく。

線速度をファクタ f 倍まで上昇させる場合、実際は圧力上限の8割程度になるようにファクタ f を設定することを奨める。さもなければ送液ポンプの圧力上限リミットエラーを高頻度で起こしてしまうことになるであろう。

(4) グラジエント溶出法プログラムの移行技法

線速度一定の場合、サンプル溶質のカラム通過時間がカラム長に比例するため、グラジエント溶出法プロ

グラムもカラム長と比例関係になる。さらに線速度を f 倍に上昇する場合にも、プログラム時間は線速度ファクタ f に反比例するので移行計算可能である。実質、この場合、移動相の送液総体積がカラム内の空隙体積に比例するようにプログラムすることと等価になる。

さらに議論を正確にすることはできる。グラジエントプログラムにより切り替えた移動相が実際にカラムに到達するまでに遅れの時間が発生する。この遅れの時間を発生させる内部体積はデュエルボリュームと呼ばれる。汎用分析用カラム使用時の遅れ時間と超高速分析用カラム使用時の遅れ時間をそれぞれ考慮してグラジエント溶出法のプログラムを移行することも可能である。

(5) 超高速分析用カラムから汎用分析用カラムの分析法へ

ここまで高速化の方向で説明してきたが、同様の議論により超高速分析用カラムを用いて開発された分析法を汎用分析用カラム向けに適用することも可能である。まず線速度一定の基準を用いて、超高速分析用カラムの条件から一義的に汎用分析用カラム向けの分析法に移行する。次に線速度一定ではおそらく圧力が高くなり過ぎるため、適正な値まで圧力を抑える線速度ファクタ f (1より小さな倍率)を見出す必要がある。ファクタ f を1/3倍とか1/5倍に下降させる。グラジエント溶出法のプログラムについても高速化同様に線速度一定とファクタ f を用いて移行技法を適用することになる。

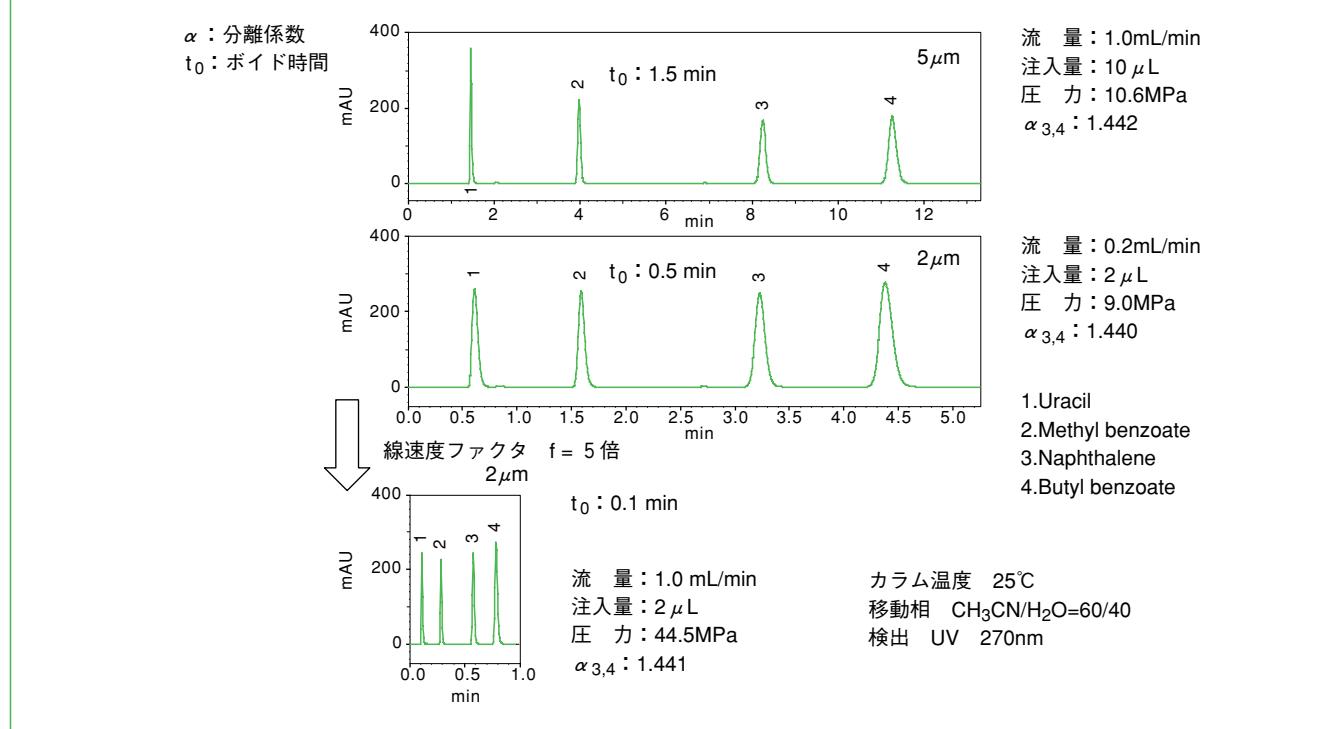
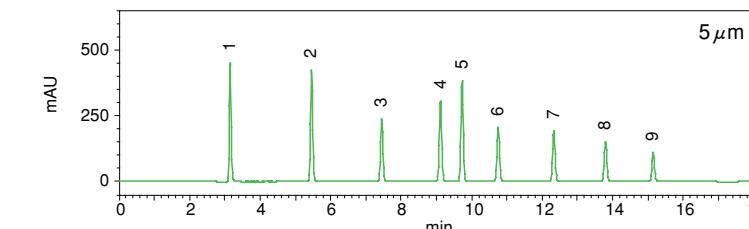


図2 イソテクラティック溶出法の移行技法適応例

t_3/t_2 : ピークNo.2,3の保持時間比率



時間(min)	% B	流量(mL/min)
0.0	65	1.0
15.0	5	
15.1	65	
20.0	65	

注入量: 10 μL
圧力: 17 MPa
 t_3/t_2 : 1.36

時間(min)	% B	流量(mL/min)
0.0	65	0.2
5.0	5	
5.1	65	
8.0	65	

注入量: 2 μL
圧力: 9 MPa
 t_3/t_2 : 1.42

1. アセトアニリド
2. アセトフェノン
3. プロピオフェノン
4. プチオフェノン
5. ベンゾフェノン
6. バレオフェノン
7. ヘキサノフェノン
8. ヘプタノフェノン
9. オクタノフェノン

カラム温度: 40°C
移動相: A: CH₃CN B: H₂O
検出: UV 247nm

図3 グラジエント溶出法の移行技法適応例

3. 分析法の結果

超高速液体クロマトグラフシステムにLaChromUltra C18カラム(逆相クロマトグラフィ用シリカゲル充填剤)を用いた分析法の結果を示す。図2は疎水性物質をサンプルとするイソクラティック溶出法の結果であり、線速度一定の基準で粒径5 μmから粒径2 μmに分析法が移行できることが示されている。また、線速度ファクタ $f = 5$ 倍で高速化できることも示された。その間、分離係数がおおむね一定であることもわかった。

図3は試料アルキルフェノンを用いたグラジエント溶出法の分析例である。同様に線速度一定で一義的にグラジエント溶出法を移行でき、また線速度ファクタ $f = 3$ 倍として高速化できることも示された。その間、2つの成分ピーク間の保持時間比率がほぼ一定になることもわかった。

4. おわりに

汎用分析用カラムから超高速分析用カラムへの分析法移行、またその逆の超高速分析用カラムから汎用分析用カラムへの分析法移行が比較的容易に実現できることがわかった。この各種関係式(図1)を用いる分析法の移行技法により充填剤粒径やカラムサイズの異なるカラム間の各種分析法の移行が円滑に行われることが期待される。

参考文献

- 1) 伊藤正人ほか: S. I. NEWS, Vol. 50 No. 1, p11-13(2007)
- 2) 伊藤正人ほか: Chromatography, Vol. 28, p101-104(2007)
- 3) 伊藤正人: 自動車技術, Vol. 62, No. 4, p90-91(2008)
- 4) Masahito Ito, et al.: Abstracts on 31st HPLC2007(2007)

U.D.C.543.544.5.08 : 543.51.07 : 577.112.34

液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier eLD

Liquid Chromatograph Mass spectrometer "NanoFrontier eLD"

照井 康* 大和田 章* 永井 伸治* 師子鹿 司*

1. はじめに

タンパク質は体を動かすためのすべての機能を受け持つ分子であり、一部特殊な種類を除き20種類のアミノ酸が鎖状に結合して作られる。さらに体内では機能に応じてリン酸や糖鎖等がタンパク質に化学結合し、修飾タンパクが生成されている。修飾タンパクは修飾基の種類と、そのタンパク内の結合位置によって発現する機能が異なる。現在、多くの疾病はタンパク質や修飾タンパクの異常に関連していると考えられており、相関を明らかにすることで創薬や早期疾病診断に繋がることから注目を集めている。

タンパク質や修飾タンパクの構造解析を行う際、用いられる機器に液体クロマトグラフ質量分析計がある。質量分析計では装置内部に測定イオンを導入し、衝突励起解離(Collision Induced Dissociation: CID)法によって分子構造の弱い部分を切断することで構造解析を行っている。しかし本方法ではタンパク質から修飾基が切断されやすく、タンパク質内の結合位置を特定することは難しかった。

この度開発、発売したNanoFrontier eLDではCID法に加え新たに電子捕獲解離(Electron Capture Dissociation: ECD)法を搭載した。本方式はLinear Ion Trap (LIT)内に電子ビームを照射し、LIT内イオンとの相互作用によりイオンを解離する。特長は修飾基がタンパク質のアミノ酸配列から外れにくいため位置情報が得られる、また、ほぼすべてのアミノ酸を等確率で切断することから、比較的分子量の大きい測定試料も構造解析可能となる点である。図1の左側がコントロールPCおよびNanoLCで、右側がECDを搭載したLinear Ion Trap-TOF/MSである。本解説ではNanoFrontier eLDの特長と測定例を紹介する。

2. 電子捕獲解離

(Electron Capture Dissociation : ECD)

電子捕獲解離は1998年にZubarev¹⁾により、ペプチドのECD反応について報告された。著者らはECD反応をフーリエ変換型イオンサイクロトロン質量分析装置(FT-ICR/MS)を用い確認した。それは、FT-ICR/MSがイオン保持のために正磁場を用いており、



図1 NanoFrontier eLDの外観

電子の低エネルギー制御が容易だったためである。その後ECD反応といえば、FT-ICR/MSの技術として発展していった。

一方2000年近傍において遺伝子の解析が盛んに行われたことは記憶に新しい。近年では、その遺伝子情報に基づいて体内で生成されるタンパク質や代謝物が、疾病や健康状態に直接関わっていることが明らかになり、疾病メカニズムの解明や新薬開発の研究現場では、それら物質の解析を広く行っている。

ECDは、タンパク質や代謝物の解析において修飾基の場所の特定が可能なことから、その技術の有用性は認められていた。しかし実装しているFT-ICR/MSは、大型かつ高価な装置であり、また操作には専門性を要する質量分析計といわれていたため、小型で安価なECDの装置開発が望まれていた。

小型のECD反応装置を実現するために、日立製作所 中央研究所の馬場ら²⁾は、ECD反応に磁場を印加したLITを用いるというアイデアを考案した。図2に開発したECD-LITの外観を示す。LITは高周波電圧が印加された4本の棒状の電極から成り、その内部に形成される高周波四重極電場により、イオンを保持する。保持した試料イオンに対し、LITの中心軸に沿って低エネルギー電子を導入し、試料イオンに照射する。LITの中心軸上には高周波成分は存在しないことを利用し、電子を導入するというアイデアである。さらに、この中心軸上に対し平行に磁場を印加することで、照

報文：液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier eLD

射した電子がらせん運動し試料イオンと効率的に衝突するようになった。結果、LIT内でECD反応が可能となり、小型のECD搭載装置が実現可能となった。

開発したECD-LITで、Substance-Pを測定試料とした際の反応時間と反応効率を図3に示す。横軸が反応時間、縦軸が反応効率である。グラフを見ると判る

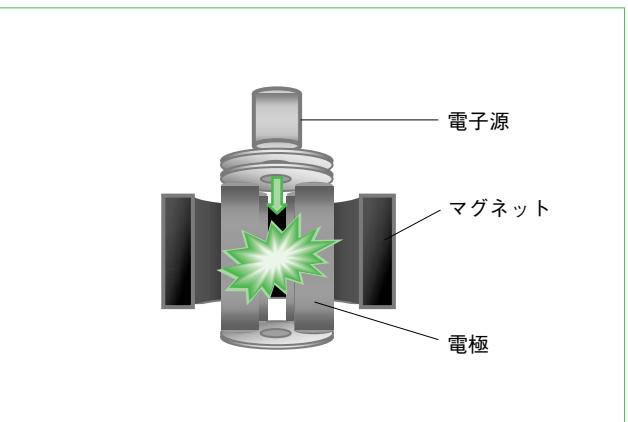


図2 ECD-LIT外観

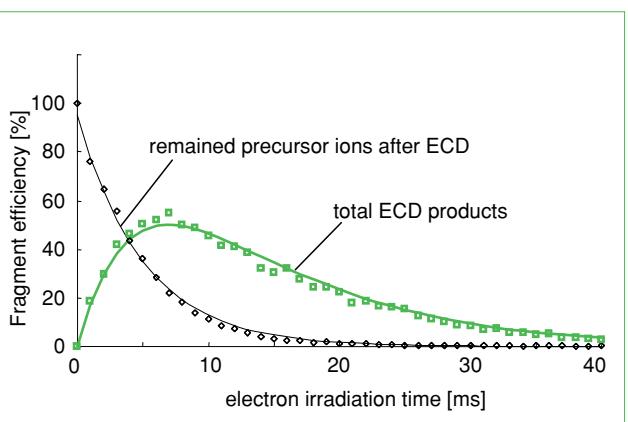


図3 電子照射時間とSubstance-P反応効率

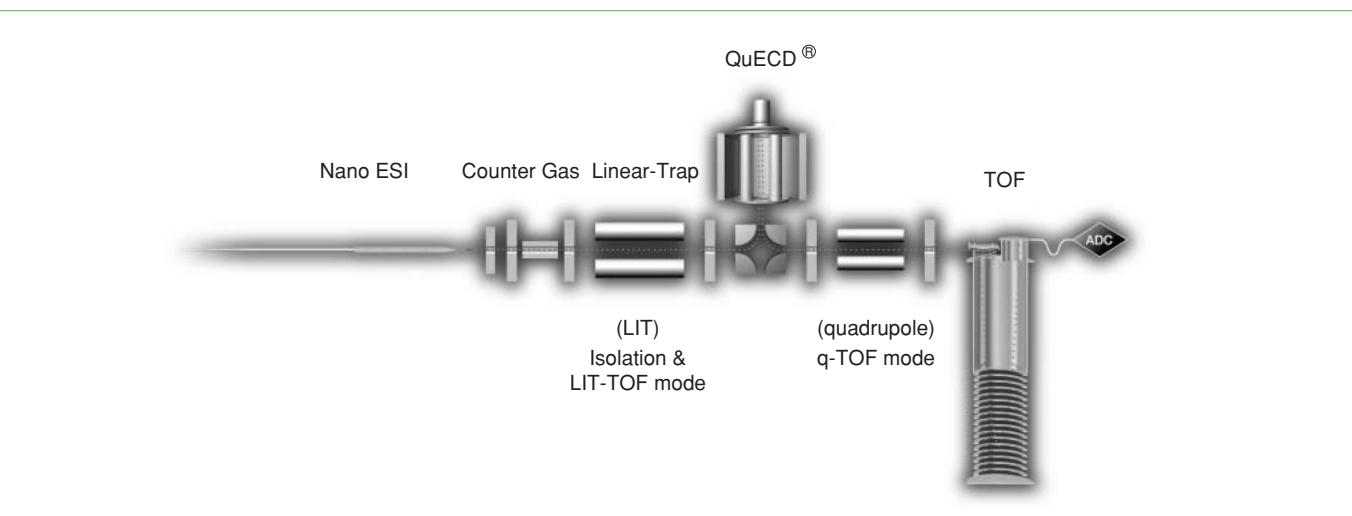


図4 NanoFrontier eLD のイオン光学系

ように約10msで反応効率が最大となっており、従来の方法であるCID法と同等の速度で動作が可能となつたことで、液体クロマトグラフと接続、分析が可能となった。

3. NanoFrontier eLDへの実装

日立ハイテクノロジーズで開発、販売しているNanoFrontierの質量分析部は、LITと飛行時間質量分析計(Time of Flight/MS : TOF/MS)のハイブリット型質量分析計であり、Iontrapによる多段イオン解離とTOF/MSによる高分解能、高精度質量分離計測が特長である。また、試料分離に用いている液体クロマトグラフのひとつに、自社開発のnano LCがあり、保持時間再現性の高さでご好評をいただいている。

質量分析部はLITとTOF/MSの間に、様々なイオン光学系を導入する事が可能であり、NanoFrontier eLDではECD反応装置を搭載した。図4にNanoFrontier eLDのイオン光学系を示す。液体クロマトグラフにより分離された測定試料をElectro-Spray Ionization(ESI)イオン源によりイオン化し、質量分析器内に導入する。試料イオンをLITに閉じこめ、イオン選択を行い、特定のイオンをECDセルに導入する。同時に電子を試料イオンに照射しECD反応を発生させる。発生したフラグメントイオンをTOF/MSに導入し、質量分離することでマススペクトルを得る。

NanoFrontier eLDでは従来からのCID法に加えて、ECD法を新たに搭載している。タンパク質解析におけるCIDとECDのフラグメント生成の違いについて図5に示す。CIDではおもにb-y系列のフラグメントが発生するが、ECDでは、c-z系列のフラグメントが発生する。またECDではタンパク質のアミノ結合の主鎖を選択的切断することから、側鎖にある修飾基の位置情報が保存される特長があり、翻訳後修飾解析に利用可能である。

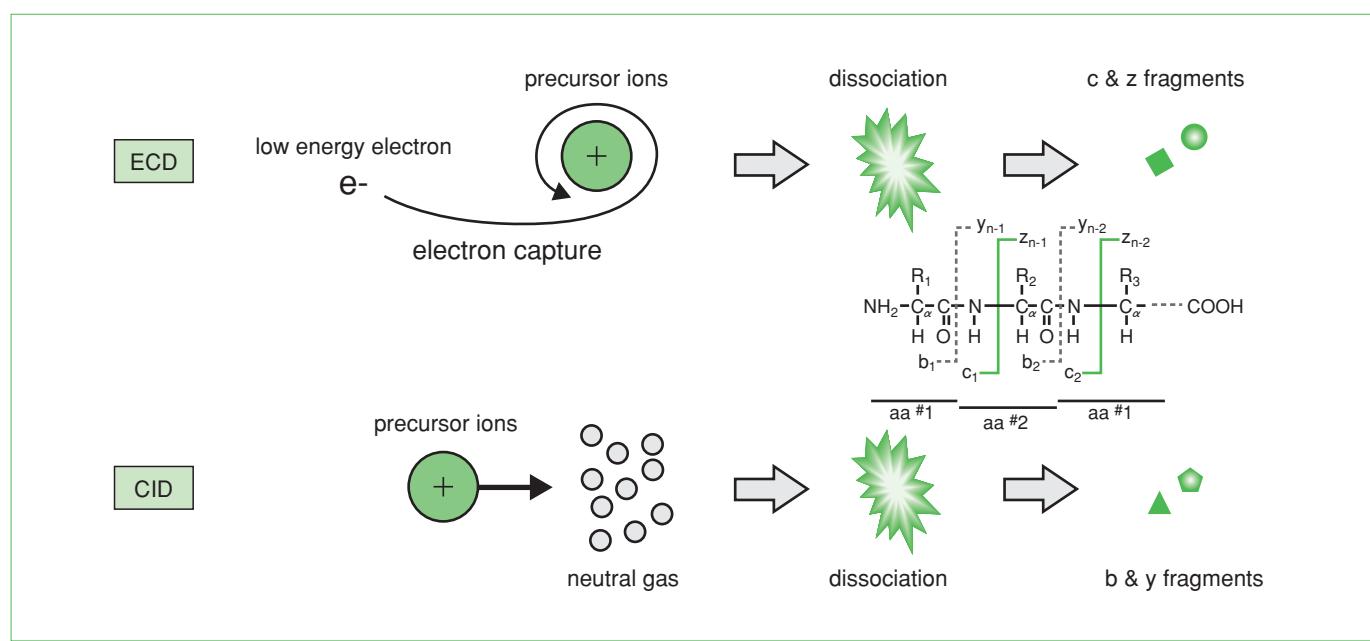
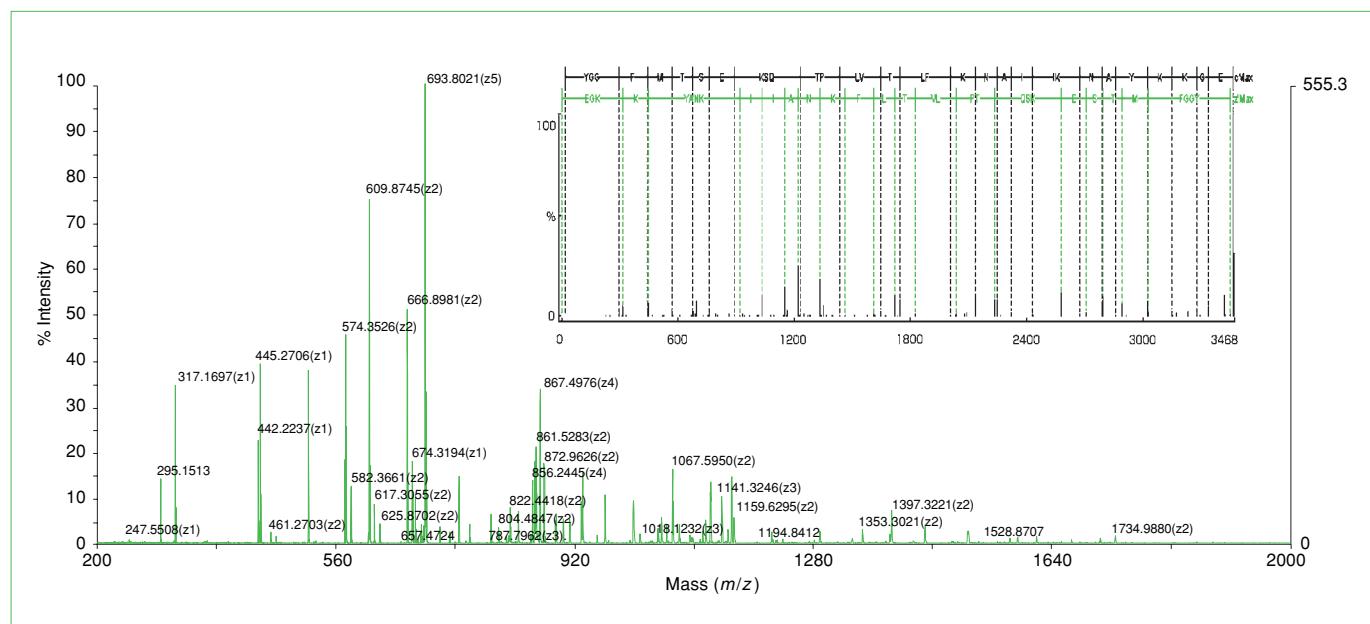


図5 ECDとCIDの解離の違い

図6 β -EndorphinのECD解析例

4. 測定例

図6に β -EndorphinをECD解析した例を示す。分子量は3465で、ターゲットイオンは m/z 693 [$M+5H$] $^{5+}$ とした。図6はECD反応後のフラグメントスペクトルであり、解析の結果90%以上のアミノ酸配列を同定することができた。

5. おわりに

NanoFrontier eLDで新たに搭載したECDにより、タンパク質解析において翻訳後修飾や糖鎖修飾で新たな情報を得ることが可能である。NanoFrontier eLDを用いることにより創薬や疾病の原因解明に繋がることが期待される。

参考文献

- 1) R. A. Zubarev et al. J. Am. Soc. Mass Spectrom. (1998) 120, 3265.
- 2) T. Baba et al., Anal. Chem., (2004) 76 4263.

日立「ノビアス」シリーズによる試料クリーンアップ技術の紹介

Sample Clean-up Method using Hitachi 「NOBIAS」 Series.

河原井 雅子*

2-1 実験

装置は、日立LaChromElite GPCクリーンアップシステム(図1)(装置構成:L-2130型ポンプ、L-2200型オートサンプラー、L-2350型カラムオーブン、L-2400型UV検出器、フラクションコレクター)に、FR1E(12mm ϕ \times 300mm)を接続して使用した。分析条件は、カラム温度40°C、移動相にはアセトニトリル:酢酸エチル=80/20(v/v)、流速1mL/min、検出波長254nmとした。

実試料は、市販品を用い、図2の手順で前処理を行った後ガスクロマトグラフ電子捕獲検出器(GC/ECD)により測定した。

2-2 結果

農薬成分標準試料の溶出容量・回収率の確認

ポジティブリスト制度における「農産物中の残留農薬GC/MSによる一斉試験法」の対象成分のうち、164成分(表1)の混合標準液を使用し、溶出容量を調べた。レナシル、フェナリモル、ジクロランは30-35mLに、メタミドホスは35-40mLに、その他の160農薬は20-30mLの分画中に検出された。



図1 日立高速液体クロマトグラフ LaChromElite GPCクリーンアップシステム

* 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂アプリケーションセンター

U.D.C.641.1/3 : 504 : 632.95 : 621.315.615.2 : 543.06

図2 NOBIAS SE-FR1Eを用いた農産物残留農薬分析前処理法

分画(溶出容量/mL)	農薬成分名
No.5(20-25)	ブチレート, テルブロス, テフルトリン, マラチオン, イソフェンホス, プレチラクロール, シハロトリン, ピリダベン, シペルメトリン, フルシリネートフルバリネット, EPTC, カズサホス, ダイアジノン, エスプロカルブ, フェントエート, ハルフェンプロックス, シラフルオフェン, フェンバレート, シフルトリン, ベンフルラリン, トリアレート, イサゾホス, イプロベンホス, プロモブチド, アセトクロール, ホスファミドン, メタラキシル, プロパニル, フェンプロピモルフ, エトフメセート, ニトロタールイソプロピル, プロマシル, アレスリン, オキサジアゾン, フラムプロップメチル, ブリメート, オキシフルオルフェン, エチオン, フルアクリピリム, ベナラキシル, カルフェントラゾンエチル, トリフロキシトロビン, ピリダフェンチオン, ピベロホス, フェノトリン, ピラゾホス
No.6(25-30)	ジクロロボス, エチオフェンカルブ(分解物), イソプロカルブ, ベンダイオカルブ, α -BHC, β -BHC, δ -BHC, トルクロホスメチル, メチオカルブ, ジエトフェンカルブ, ジメチルビンホス, イソフェンホスP=O, E-クロロフェンビンフォス, Z-クロロフェンビンホス, トリアジメノール, パクロブトラゾール, キノメチオネット, フルトラニル, p,p'-DDE, フェンスルホチオ, プロビコナゾール, テニルクロール, カブタホール, ホサロン, メフェナセッタ, ピリミジフェン, デルタメトリン, フェノブカルブ, クロロプロラム, チオメトン, ジメチビン, γ -BHC, パラチオニメチル, カルバリル, フェニトロチオ, ジクロフルアニド, チオベンカルブ, フェンチオ, ホスチアゼート, Z-ピリフェノックス, キャプタン, E-ピリフェノックス, プロチオフォス, クロロベンジレート, p,p'-DDD, メプロニル, エジフェンホス, イプロジョン, EPN, テブフェンピラド, ピリプロキシフェン, ピリプロキシフェンピラクロホス, ペルメトリン, ヘプタクロル, アルドリン, フサライド, o,p'-DDD, エンドリン, クロロニトロフェン, p,p'-DDT, プロシミドン, XMC, テクナゼン, カルボフラン, キントゼン, シマジン, アトラジン, プロビザミド, ベノキサコール, アメトリン, プロメトリン, プロモホスメチル, フサライド, ジメタメトリン, メチダチオ, テトラクロロビンホス, α -エンドスルファン, プロフェノホス, (E)-メトミノストロビン, (Z)-メトミノストロビン, イソキサチオ, β -エンドスルファン, オキサジキシル, キノキシフェン, ヘキサジオ, プロモプロビレート, メトキシクロル, ホスマット, テトラジホン
No.5-6(20-30)	エトプロホス, ピリミホスメチル, メトラクロル, エトリムホス, ピリミカルブ, ベンフレセート, クロルピリホス, パラチオ, ベンディメタリン, ビンクロゾリン, プロバクロール, プロボキスル, クロマゾン, シアノホス, クロルピリホスメチル, クロタールジメチル, ジフェナミド, ジメビレート, フェノチオカルブ, ナプロバミド, イソプロチオラン, ジクロホップメチル
No.7(30-35)	レナシル, フエナリモル, ジクロラン
No.8(35-40)	メタミドホス

表1 NOBIAS分画カラムを用いた各農薬成分の溶出位置(質量分析計により測定)

従来のGPCとの比較

従来のGPCカラムとNOBIAS分画カラムを比較するために、ホウレンソウ抽出液に標準試料(農薬15成分、表2)を添加した際のクロマトグラムを比較した(図3)。FR 1 Eカラムは従来のGPCカラムに比べて農薬分画範囲が狭いこと、農薬分画に混入する夾雑成分が少ないことが示された。夾雑物の混入は、定量精度に大きく

影響するため、農薬成分と夾雑成分を分離して分取することが重要である。本カラムを用いると、従来のGPCカラムと比べて農薬成分の分画容量が少量となり、溶出分画を濃縮や溶媒置換することなく直接GC/ECDに注入し、基準値レベルの濃度を定量することが可能であった。

Pesticides	Recovery \pm SD(%)	RSD(%)
α -BHC	89 \pm 2.5	2.8
β -BHC	91 \pm 3.5	3.9
γ -BHC	90 \pm 1.7	1.9
δ -BHC	106 \pm 2.5	2.4
ヘプタクロル	89 \pm 2.5	2.8
アルドリン	86 \pm 1.5	1.8
フサライド	93 \pm 3.1	3.3
p,p'-DDE	89 \pm 0.6	0.7
o,p'-DDD	89 \pm 2.1	2.3
エンドリン	96 \pm 8.6	9.0
p,p'-DDT	88 \pm 3.8	4.3
クロロニトロフェン	88 \pm 2.6	3.0
シペルメトリン-1	90 \pm 3.5	3.9
フェンバレレート-1	89 \pm 1.7	2.0

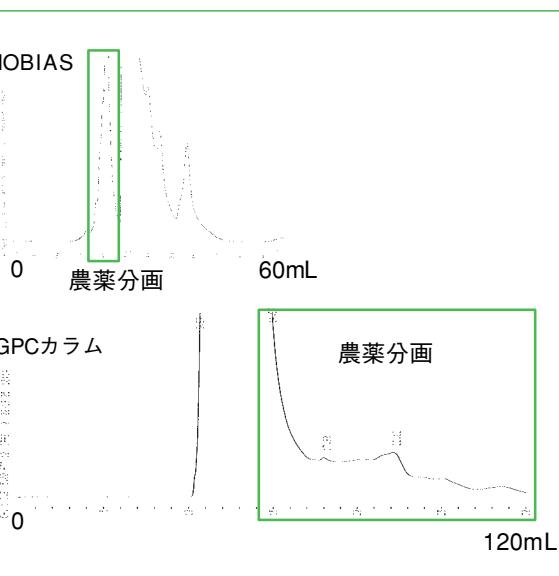


図3 NOBIAS分画カラムと従来のGPCカラムによるクロマトグラムの比較

表2 NOBIAS分画カラムによるホウレンソウ抽出液への各農薬成分添加回収率(GC/ECDにより測定)

と絶縁油成分の分離に適していることを見出した。SG 1を用いた自作固相抽出カラムによるクリーンアップ法を紹介する。

3-1 実験

操作フローを図4に示す。SG 1(粒子径60 μ m)充填剤3gを、ガラスカラム(14mm ID)に湿式充填し、固相抽出カラムを作成した。n-ヘキサンを移動相として初流液に溶出する絶縁油成分を捨てPCB分画を分取した。

分析精度の確認にはPCBを含まない絶縁油新油にPCB標準試料(カネクロール混合品)を添加した試料を用いた。PCBの測定にはGC/ECDを用いた。

3-2 結果

SG 1 固相抽出法によるPCB標準添加絶縁油のGC/ECDによるクロマトグラムと検量線を図5, 6に示す。直線性(R^2)は0.9960であった。SG 1 固相抽出クリーンアップを行った絶縁油(PCB 1 mg/kg), 4 検体をGC/ECDにより測定した。総ピーク高さによる定量結果から得られた再現精度は, RSD 3.2%(n=4)であった。検出下限を標準偏差の3倍とすると, 0.093mg/kgであり, PCB廃棄物か否かの判定基準0.5mg/kgの判断が可能であった。

実試料20検体における告示法との分析値の相関を図7に示す。相関係数は0.9835で、本分析法が実用可能であることが示された。

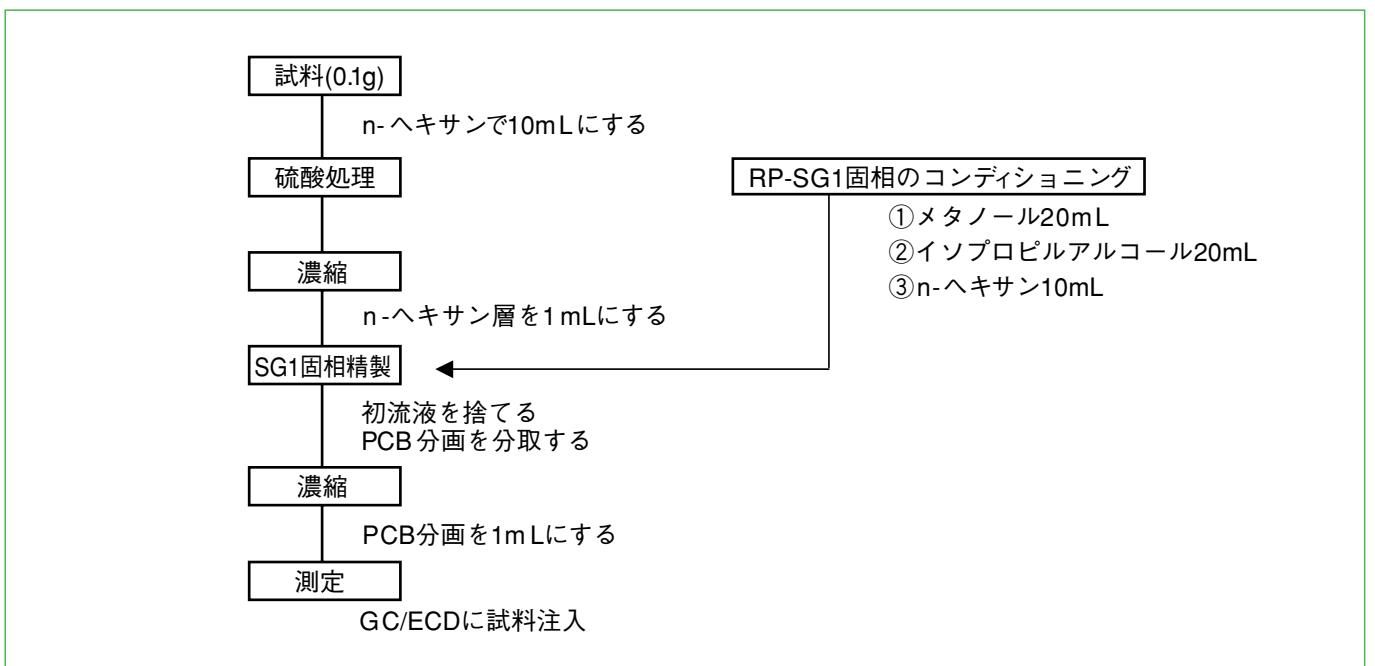


図4 SG 1 固相抽出法による絶縁油中PCB分析の操作フロー

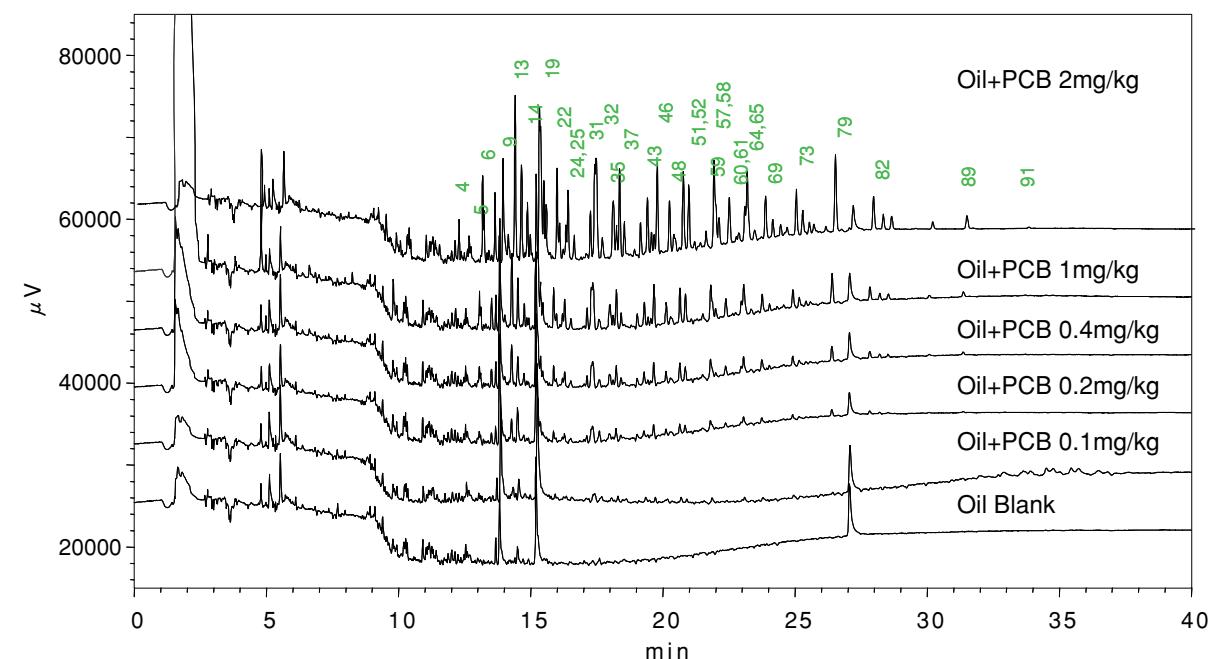


図5 SG 1 固相抽出法によるPCB標準添加絶縁油試料のクロマトグラム

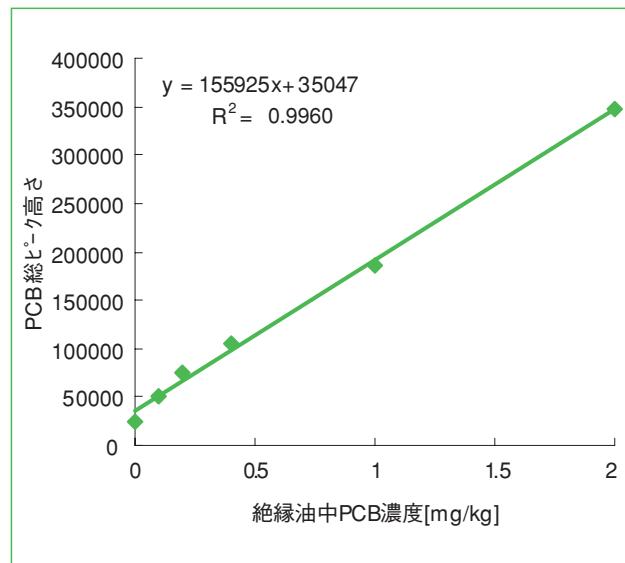


図6 SG 1 固相抽出法によるPCB標準試料の検量線

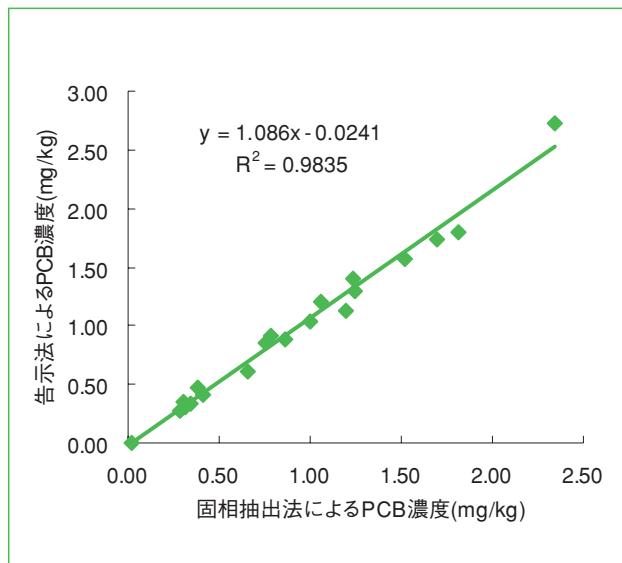


図7 実試料20検体におけるSG 1 固相抽出法と告示法の相関

4. まとめ

これまでにはない特性をもつノビアスシリーズを利用し、農産物中の農薬、絶縁油試料中のPCB分析の前処理を簡易化し、有機溶媒使用量の削減が可能となった。また、高い精製効果が得られたため高精度に分析を行うことができた。今後、LCクリーンアップシステムの自動化を進めることにより、更に分析前処理の簡便化を推進していく予定である。

5. 参考文献

- 1) 平成17年厚生労働省告示第497,498,499号
- 2) 平成19年11月15日厚生労働省通知食安発第1115001号
- 3) 低濃度PCB汚染物対策検討委員会原因究明ワーキンググループ：低濃度PCB汚染物に関する原因究明調査報告書概要（2005）
- 4) 野馬幸生、第44・45回日本環境化学会講演会予稿集p.65（2007）
- 5) 平成4年厚生省告示第192号別表第2

学会発表 ミニファイル

1. 第13回LCテクノプラザ(2008/1/31~2/1 千葉県)

清水(日立ハイテクノロジーズ)、他：モノリスカラムを用いた超高速分離の検討

井上(日立ハイテクノロジーズ)、他：陽イオン交換樹脂を用いたテアニンを含む茶の遊離アミノ酸一斉分析

【要旨】テアニンは茶に特異的に含まれているアミノ酸で、茶の旨み成分であるとともに、リラックス効果があるとして、近年、注目されている成分である。これまで、陽イオン交換HPLC-ポストカラムニンヒドリン法を用いてテアニンを分析しようとすると、他のアミノ酸成分とピークが重なるため、あらかじめ別の方法で同一溶出時間に検出される成分が含まれないことを確認しておく必要があった。今回、遊離アミノ酸40成分とテアニンとを一斉分析できる分析条件の検討を行った。また、茶葉からアミノ酸を効率よく抽出し、且つ、本分析法に注入可能な試料の調製方法についても検討を行った。

本検討にはL-8900形 高速アミノ酸分析計(株日立ハイテクノロジーズ製)を用いた。溶離液は、クエン酸-クエン酸リチウム緩衝液 L-8500 PF-Kit(三菱化学株式会社)を基に、必要に応じて試薬成

分を増減させた。標準試料は和光純薬工業株製アミノ酸混合標準液AN-II型、B型、L-アスパラギン、L-グルタミン、L-トリプトファンおよび東京化成工業株製 L-Theanineを混合し調製した。分離カラムは、#2622 4.6mmI.D.×60mm(株日立ハイテクノロジーズ製)にガードカラム#2619 4mmI.D.×5mmを接続して用いた。遊離アミノ酸40成分とテアニンを5液のグラジエントにより分析するプログラムの作成を試みた。第1溶離液のエタノール含量を減少させると、テアニン(Theanine)とサルコシン(Sar)の分離度が向上するが、他の遊離アミノ酸において分離の低下がみられたため、分離状態のバランスを考慮し、エタノール含量を0.4%に決定した。同様に溶離液中のクエン酸量、カラム温度、グラジエントプログラムについて検討を行い、図に示すクロマトグラムを得た。

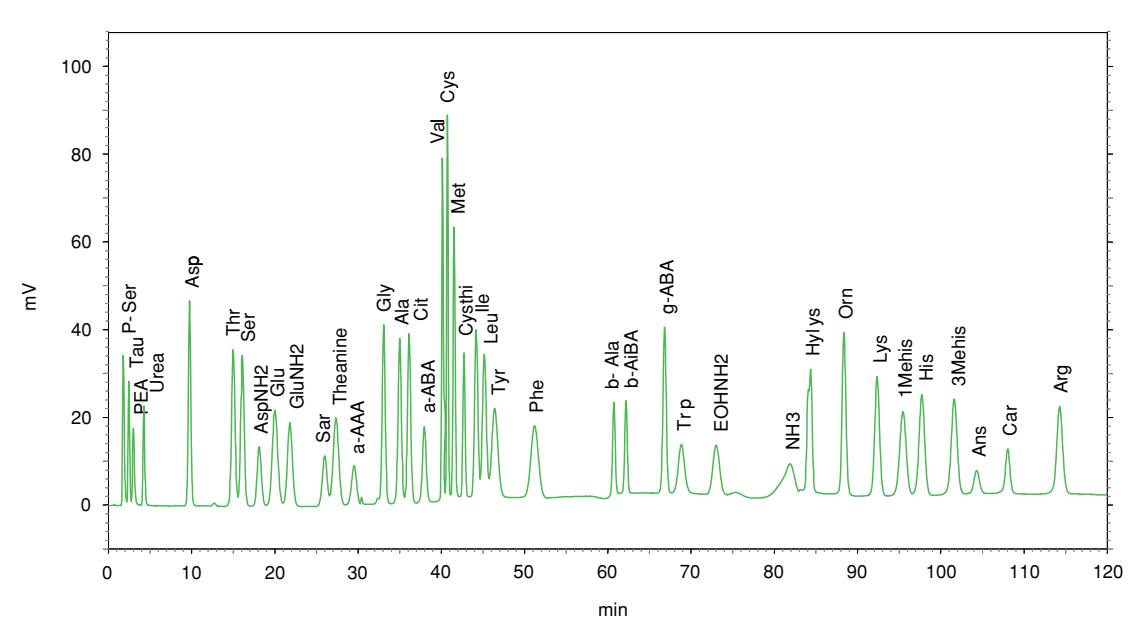


図 標準試料のクロマトグラム

2. 第二届全国生命分析化学学术报告与研討会(2008/3/28~30 中国)

清水(日立ハイテクノロジーズ), 他: 超高速LCによる蛍光誘導体化脂肪酸の高速分析

3. 32nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (2008/5/10~16 米国)

M. Ito(日立ハイテクノロジーズ), 他: Ultra High-Speed Liquid Chromatograph System with High-Permeability Columns

[Summary] We have developed Ultra High-Speed Liquid Chromatograph Systems, LaChrom-Ultra. In order to achieve high-speed analyses by reverse phase chromatography, we use columns with 2-micrometer packing particles of silica gel. The columns have good properties of both high number of theoretical plates and high column permeability. LaChromUltra system is suitable for the high-speed and high-resolution columns. The system consists of gradient elution pumps and autosampler with high-pressure resistance of 60 MPa, and several detectors with high-speed response of 10 ms.

We have three kinds of columns with 2-micrometer, 3-micrometer, and 5-micrometer packing particles. The particles of octadecylsilyl

silica have the equivalent properties of chemicals. We have analyzed standard compounds by using 50, 75, and 100 mm x 2.0 mm i. d. column with 2 micrometers. And we have also analyzed them by using 100 mm x 4.6 mm i. d. column with 3 micrometers, and 150 mm x 4.6 mm i. d. column with 5 micrometers. We have studied the properties of the columns by using the kinetic plot method. We have calculated the plate times and the impedance times. For example, the permeability of the column is seven femtometer square, which is approximately half as much as that of usual sub 2-micrometer particle columns. The Height Equivalent to the Theoretical Plate can reach six micrometers. Therefore, good separation impedance of 5,000 can be obtained.

4. 第56回質量分析総合討論会(2008/5/14~16 茨城県)

渡邊(日立ハイテクノロジーズ), 他: LIT-q-TOF質量分析計による高速ECD分析(ランチョンセミナー)

[Summary] We introduce a new compact device for electron capture dissociation (ECD) analysis, QuECD, and a new linear ion trap-q-TOF mass spectrometer equipped with QuECD, the NanoFrontier eLD. ECD is an alternative fragmentation mechanism for use in peptide analysis via tandem mass spectrometry. It has advantages over conventional collision-induced dissociation (CID) in the analysis of post-translational modifications of proteins as well as the analysis of large peptides. QuECD achieves

high throughput ECD on the same timescale as conventional CID by using radio-frequency linear ion trap technology. This is a significant departure from conventional ECD which generally requires complex and maintenance-intensive FT-ICR mass spectrometers. The NanoFrontier eLD enables LC-ECD-MS/MS analysis. The results shown here demonstrate the NanoFrontier eLD's capability to analyze post-translational modifications and to perform de novo sequencing of large peptides.

5. 日本分析化学会第69回討論会(2007/5/15~16 愛知県)

山本(日立ハイテクノロジーズ), 他:ジフェニルカルバジドとノビアス固相充填カラムを前処理に用いるRoHS関連試料中6価クロムの高感度分析(テクノレビュー)

鈴木裕(日立ハイテクノロジーズ), 他:超高速LCを用いたキノロン剤分析の高速化
坂元(日立ハイテクノロジーズ), 他:紫外線照射による有機ヒ素化合物の分解挙動の検討

6. 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry(2008/6/1~5 米国)

Y. Sasakura(日立ハイテクノロジーズ), 他: Multiple Protease Digestion Using Immobilized Enzymes: An Effective Sample Preparation Method for the Protein Structural Analysis by Mass Spectrometry.

[Summary] Protein is biosynthesized by transcription and translation, and their function is extended by posttranslational modification (PTM). For the PTM analysis using MS, protein is initially digested into peptides with proteases. However, the detection of modified peptides tends to be inhibited by their low ionization efficiency. In addition, scan rang limitation of the MS disable the detection of the peptides beyond. Therefore, to enhance the sequence coverage and identify the PTM structure of the proteins, the peptide suitable for these analyses needed to be prepared by various protease treatments. In our previous study, the immobilized protease technique was shown to be effective and convenient for the protein digestion. Here, we applied this method to the multiple protease digestion and evaluated its effectiveness.

Three kinds of proteases (trypsin, LysC, V8) were immobilized on the single solid surface, and used to digest BSA, beta casein and ovalbumin as model proteins. For the sample convection, the vibration reaction unit, which was developed in our previous study (Anal. Chem. Insights, 2007, 2, 69-74), was used. Digested proteins were analyzed using MALDI-MS and NanoLC-LIT-TOF-MS, followed by a database search using MASCOT software. The results of the number of

the identified peptides, protein score, sequence coverage, and identification of the phosphopeptides were compared.

Digestion using different proteases resulted in the identification of different peptide sequences. Consequently, the combination of these individual results provided higher sequence coverage. For example, the sequence coverage of BSA, beta-casein and ovalbumin were increased from 56-76% to 89%, 16-21% to 32%, 14-51% to 65% in the LC-MS analysis, respectively. These results suggest that the protein digestion using multiple proteases is effective to improve the accuracy of protein identification in the MS analysis. The detection of the phosphopeptides were changed depending on the proteases used for the analysis; phosphopeptides from beta-casein and ovalbumin were identified only in their LysC and V8 digests, respectively. Therefore, it suggests that the utilization of the multiple kinds of proteases should be considered for the protein phosphorylation analysis. This technique is universally applicable to various PTM analyses, and also, the combination with recent new ion-dissociation techniques such as Electron Capture Dissociation (ECD), seems to be advantageous.

Gary L Glish (University of North Carolina), et al.: Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry using Ion Trap based Electron Capture Dissociation.

7. 第50回日本脂質生化学会(2008/6/5~6 徳島県)

長塚(理化学研究所), 他: 中枢神経系における生理活性脂質ホスファチジルグルコシドと関連化合物のナノLC-MS/MSを用いた検出と定量

8. 第17回環境化学討論会(2008/6/11~13 兵庫県)

河原井(日立ハイテクノロジーズ), 他: 絶縁油中低濃度PCBs分析におけるクリーンアップ法の検討

【要旨】 NOBIAS RP-SG 1 の充填剤(株日立ハイテクノロジーズ製, フェニル基とジオール型水酸基をもつジビニルベンゼン/メタクリレート共重合体: SG 1 と略す)を用いるPCBと絶縁油成分の前処理法について検討した。SG 1 をカートリッジとして用いた固相抽出法と, カラムとして用いたLC法の2つの方法において, 絶縁油中の低濃度PCBs分析におけるクリーンアップ法を検討し, それぞれのクリーンアップ法を確立した。次に, これらの方で, 実試料測定における告示法との相関を調べた。一例として, 技術評価試料を硫酸処理し, LCクリーンアップ法によりPCB濃度を求め, 告示法により得られたPCB濃度((財)産業廃棄物処理事業振興財团公表値)と比較したところ, 相関係数(R^2)0.987, 誤差の標準偏差 0.09mg/kgが得られた(図)。これらの方法を用いることで, 絶縁油中の低濃度PCB(0.1~2 mg/kg付近)を高精度(RSD 7.1%以下)

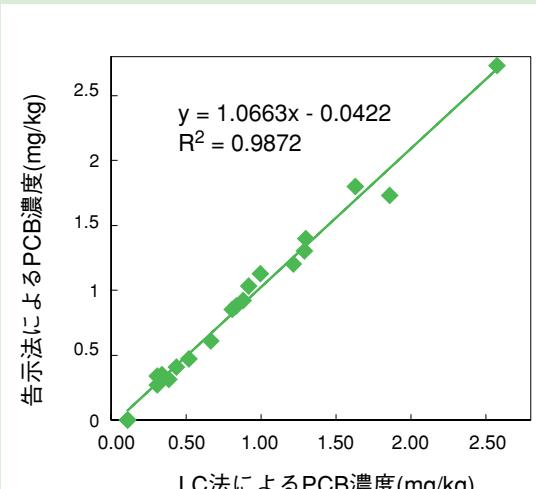


図 告示法とLC法の相関

9.

K. Deguchi(北海道大学), 他: Two-dimensional hydrophilic interaction chromatography coupling anion exchange and hydrophilic interaction columns for separation of 2-pyridylamino derivatives of neutral and sialylated N-glycans. *J. Chromatogr., A* 1189(2008) 169-174.

10.

Y. Takegawa(北海道大学), 他: Chromatographic deuterium isotope effects of derivatized N-glycans and N-glycopeptides in a zwitterionic type of hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, 31(2008) 1594-1597.

11.

Y. Takegawa(北海道大学), 他: Profiling of N- and O-glycopeptides of erythropoietin by capillary zwitterionic-type of hydrophilic interaction chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 31(2008) 1585-1593.

液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)アプリケーションノート

日立ハイテクが発行している液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)の“アプリケーションノート”のご紹介です。

LC/MSによる複雑な試料の比較解析例について(1)

機種 液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier

シートNo NF/AN-011 発行日 2007年9月

要約 血清などのように非常に多くの成分が含まれている試料では、クロマトによる分離の限界を超えているようなケースが一般的です。そこで、同時に溶出する成分を, m/z (mass-to-charge ratio)によって分離し、保持時間と m/z およびイオン強度から成る3次元のデータを得ることが、質量分析装置の大きな役割となります。しかし、マスクロマトグラムやマススペクトルのような2次元の表現手段のみでは、複雑な成分の分離状況を把握することは難しいのではないか? 本稿では、保持時間と m/z に対するイオン強度の違いを色で示した2次元マップによって、分離の状況や試料の差異を把握した一例を紹介します。

nanoLC/LIT-TOF MSとマスクロマトグラムデータベースによる定量的プロテオミクス

機種 液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier LD

シートNo NF/AN-012 発行日 2007年11月

要約 質量分析法によってタンパク質の発現プロファイルの定量的な比較を行うためには、安定同位体による標識を行い、同位体ピークの比より試料間の存在比を定量するといういくつかの方法が確立されています。安定同位体を用いる方法は、変動を非常に鋭敏に検出できますが、試料によってはその前処理操作による誤差が問題となることがあります。また、標識試薬は高価で、一般にやや煩雑な操作を要します。本稿では、新しいユーティリティーを用いて、試料を標識なしで分析したマスクロマトグラムからペプチドあるいはタンパク質の存在量を定量し、発現差異解析を行った例について紹介します。

日立高速ECD(QuECD®)のご紹介

機種 液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier eLD

シートNo NF/TN-001 発行日 2008年3月

要約 質量分析装置を用いたタンパク質の翻訳後修飾解析において、従来から用いられてきた解離方法である衝突誘起解離(Collision-Induced Dissociation: CID), そしてFT-ICR質量分析装置を用いた電子捕獲解離(Electron Capture Dissociation: ECD)の持つ課題を克服する新しい技術として、日立グループはハイスループットな小型ECDデバイス, QuECD®を開発しました。QuECD®は高周波リニアイオントラップ(LIT)技術を応用することにより、従来のFT-ICR質量分析装置を用いたECDよりも低コストで、かつCIDと同等に反応速度の早いECD反応を実現しました。このQuECD®を搭載したNanoFrontier eLDは高速ECDを生かしたLC-ECD-MS/MS測定のほか、CIDとECDを組み合わせた測定が可能です。本稿では、QuECD®モードの原理と応用例について紹介します。

詳細の情報は下記のアドレスにアクセスいただければ、ご覧いただけます。

http://www.hitachi-hitec.com/science/api/api_ms.html

テクニカルデータ発行ミニファイル

日立ハイテクが製品別に発行しているアプリケーションデータシート“TECHNICAL DATA”的紹介です。

題目	分光光度計を用いたクロメート皮膜中の6価クロムの分析 Analysis of Cr(VI) in Chromate Passivation film by diphenylcarbazide method	
機種	U-1900形日立レシオビーム分光光度計 Model U-1900 Ratio Beam Spectrophotometer	
シートNo	UV-VIS No.143	発行日 2008年4月
要約	<p>2006年7月1日に施行されたRoHS指令(電子・電気機器に含まれる特定有害物質の使用制限に関する欧州連合(EU)の指令)で使用制限対象となった有害物質は、無機物質4成分(鉛、水銀、カドミウム、6価クロム)と有機物質2成分(ポリ臭化ビフェニル、ポリ臭化ジフェニルエーテル)です。</p> <p>無機物質の中でも特にクロムのみが化学形態による使用制限が設けられ、ICPなどでは前処理が複雑な「6価クロムの選択的な検出」が必要となっています。ここでは、装置の導入も含めユーザーに簡易な方法のひとつとして、U-1900形分光光度計を用いたクロメート皮膜中の6価クロムの分析例を紹介します。</p>	

題目	アスタキサンチン、カンタキサンチンの分析 Analysis of Astaxanthin and Canthaxanthin	
機種	L-2000形日立高速液体クロマトグラフ Model L-2000 Series High Performance Liquid Chromatograph	
シートNo	LC No.200	発行日 2008年4月
要約	<p>アスタキサンチンとカンタキサンチンはカロテノイド系色素の一種で、水産動物の色調強化を目的に飼料添加物として使用されています。カンタキサンチンについては、畜水産食品に係る残留基準値が設定され、鮭やイクラで20ppm (mg/kg)、鶏卵(卵黄)で25ppm (mg/kg)が定められています。ここでは、L-2455形ダイオードアレイ検出器を用いた紅鮭の分析例を紹介します。</p>	

題目	超高速LCを用いた食品中の安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸の分析 Analysis of Benzoic Acid, Sorbic Acid and Dehydroacetic Acid in Food by Ultra High-Speed LC	
機種	日立超高速液体クロマトグラフLaChromUltra Ultra High-Speed Liquid Chromatograph, LaChromUltra	
シートNo	LC No.201	発行日 2008年6月
要約	<p>安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸は、微生物の増殖を抑制し、食中毒を予防する目的で、保存料として食品に添加されています。これらの成分は指定添加物として食品衛生法に収載されており、HPLCを用いて測定が行われています。ここでは、日立超高速液体クロマトグラフLaChromUltraを用いた食品保存料の高速分析例を紹介します。</p>	

題目	ニンヒドリン-ポストカラム法を用いたアミノ酸の分析 その2 Analysis of amino acids by Ninhydrin post-column method	
機種	L-2000形高速液体クロマトグラフ Model L-2000 Series High Performance Liquid Chromatograph	
シートNo	LC No.202	発行日 2008年6月
要約	<p>GABA(γ-アミノ酪酸)、オルニチンはアミノ酸の一種で広く自然界に存在し、さまざまな作用があることから近年注目されています。ここでは、新しく開発した4液高分離分析法を用いたきなこ、醤油の分析例を紹介します。従来法では測定対象としていなかったGABA、オルニチンを加え、かつイソロイシン-ロイシンの分離が向上しています。</p>	

題目	固相抽出を前処理に用いる河川水および海水中の6価クロムの電気加熱原子吸光分析 Analysis of Cr(VI) in river water and sea water by Electrode atomic absorption method with solid phase extraction.	
機種	Z-2010シリーズ日立偏光ゼーマン原子吸光光度計 Model Z-2010 Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer	
シートNo	AA No.117	発行日 2008年2月
要約	<p>有害物質の6価クロムは、公共用水域の水質汚濁に係る環境基準において0.05mg/L以下と規制値が定められています。水溶液中の6価クロムの測定方法としては、ジフェニルカルバジド(DPC)-吸光度法が公定法などで採用されています。しかし、この方法は定量下限が0.01mg/L程度であるため、測定を妨害する物質が多く混在する河川水や海水中に対しては感度が不足し、測定は非常に難しいことが知られています。</p> <p>今回、固相抽出を前処理に用い、電気加熱-原子吸法によって河川水および海水中の6価クロムをより簡易に高感度に測定することができるようになりました。</p>	

題目	グラファイト炉法による温度プログラム自動作成機能を用いた測定例 Application Data by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer with Temperature Program Development Function	
機種	Z-2010シリーズ日立偏光ゼーマン原子吸光光度計 Model Z-2010 Polaized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer	
シートNo	AA No.118	発行日 2008年3月
要約	<p>グラファイト炉原子吸光法では、サンプルを原子化するための「乾燥・灰化・原子化」という各工程における温度や時間が安定した測定を行う上で重要な分析条件となります。</p> <p>装置導入時には、多種多様なサンプルに対して対応が可能な分析条件が元素ごとに組み込まれていますが、この初期条件はマトリックスが複雑なサンプルに対しては最適化されていない場合があります。これまでサンプル毎に最適なプログラムを構築するには、条件を入力し繰り返し検討する必要があります、手間と時間を要していました。</p> <p>Z-2010は、乾燥・灰化・原子化の最適温度及び時間を自動で構築する“温度プログラム自動作成”機能を搭載しています。この機能により最適な分析条件の構築作業を原子吸光測定の初心者でも簡単に行うことが可能になりました。</p>	

ここで紹介しているアプリケーションデータの詳細をご希望の場合は下記のアドレスよりお申込みいただき、S.I.navi(会員制サイト)にご入会いただければ直接インターネットで参照することができます。

<http://www.hitachi-hitec.com/sinavi/>

新製品紹介 NEW PRODUCTS

液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier eLD

近年、ヒト遺伝子情報の解明から、体内で生成されるタンパク質や代謝物が疾病等の健康状態に関わっていることが明らかになり、タンパク質や代謝物の分析手法として質量分析装置の重要性が増大しています。日立ハイテクノロジーズでは、2008年6月に電子捕獲解離法(ECD法)を搭載した液体クロマトグラフ質量分析計NanoFrontier eLDを発売いたしました。

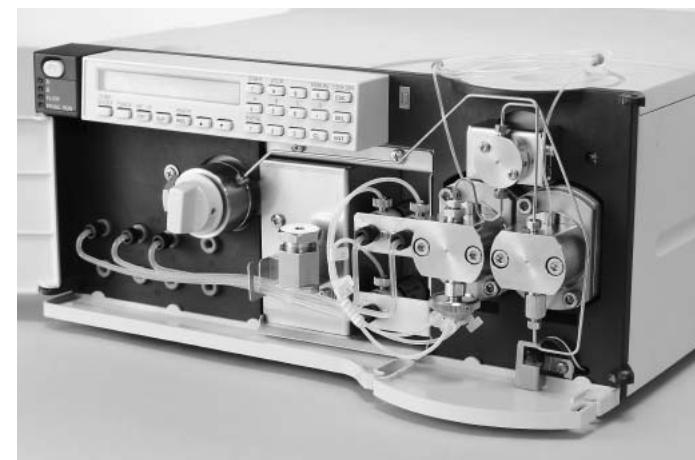
特長

- ・日立独自の高速ECDを搭載しました。修飾部位の情報を含んだ高精度なタンパク質の解析を行うことが可能です。
- ・飛行時間質量分析計の性能改良を行い質量精度、分解能を向上しました。
- ・イオン光学系を変更し、装置感度を向上しました。



超高速液体クロマトグラフ LaChromUltraシステムのアクセサリおよびカラムラインナップを強化

超高速液体クロマトグラフ LaChromUltraシステム用アクセサリとして、ソルベントセレクタユニットおよび6カラムセレクタバルブを開発しました。超高速液体クロマトグラフのニーズとして、異なる移動相およびカラムの組合せによる分析条件検討の自動化があります。ソルベントセレクタユニットでは、ポンプ毎に最大3液の移動相の組み合わせ(合計9条件)による分析条件検討、6カラムセレクタでは、最大6本のカラムの自動切り替えを可能としました。また、従来のLaChromUltra C18(2 μm)カラム50mmLに加えて、カラム長さ75,100mLをラインナップしました。これにより、高分離分析のニーズにも対応できます。



ソルベントセレクタ
(L-2160U形ポンプ内蔵)

U-3900形拡張試料室の紹介

このたび中形分光光度計U-3900/3900H形の付属品として、拡張試料室を発売いたしました。

拡張試料室は、U-3900/3900H形に標準搭載されている試料室を拡張し、固体系試料の測定を行うための付属品です。拡張試料室内に、積分球付属品や正反射付属品装置などを組み込んで測定することにより、固体系試料の反射、偏光、透過特性測定が可能で、特に液晶用フィルタ、反射板、レンズなどの光学部品の測定に有効です。



マルチグレーティングマイクロプレートリーダーがハイエンドクラスのTOPをめざします。



日立製の高性能回折格子を搭載したダブルモノクロ式のマルチタイププレートリーダーを大幅にバージョンアップし新発売します。ベストセイラーをコンセプトに、お客様が、蛍光、時間分解蛍光、発光、吸光測定機能から、必要な機能だけを選択でき、納入後の追加搭載も可能です。さらにマルチリーダーのスピリットを生かしたプロトコル組み合わせ機能を採用しました。自由度が高い操作性は、バイオの幅広い応用測定に有効です。

ご挨拶

株式会社日立ハイテクノロジーズ
代表執行役 執行役専務 兼 取締役, CRO
ライフサイエンス営業統括本部長

中野 和助



平素より、日立ハイテクノロジーズの分析装置をご利用いただき、また、本S.I.News(Scientific Instrument News)をご愛読いただき、誠にありがとうございます。

私は、入社以来、一貫して半導体検査・評価・製造装置の事業に携わって参りましたが、本年4月に、ライフサイエンス営業統括本部長に就任いたしました。どうぞ、よろしくお願い申し上げます。

半導体検査・評価・製造装置の根幹技術は、電子顕微鏡や分光光度計の原理・方式の発展系技術です。またライフサイエンス事業における臨床検査装置は、分光光度計の検出系と高度システム化技術が融合した製品です。このように、多くの産業分野における応用機器の根幹技術は、分析装置の原理・方式に依拠しています。ところが、近年、新たな原理による分析法が生まれる確率が、昔に比べ少なくなっています。

一方、一般分析装置と医療用臨床検査装置においては、遺伝子診断研究の進展や、質量分析技術の応用範囲の拡大などにより、両者の垣根が低くなり、例えば、研究→臨床→診断への流れがスピードアップ

し、研究・開発・製造の一貫した構築が求められています。このような環境の下、ライフサイエンス事業において、バイオ分析部門と医用部門の研究開発、設計の連携強化とリソースの共通化を推進し、皆様が恩恵を享受できる診断分野へ、研究現場で発見・発明された成果を迅速に展開し、貢献したいと考えております。

医療診断以外の分野でも、最近は、食の安全、資源の枯渇や高騰によるエコロジー技術に対する社会的要望がますます強くなってきています。光学技術、成分分離技術、検出技術をコアとする日立ハイテク自社製品の開発強化、国内外の先端分析装置の導入・提供により、皆様の研究開発、品質管理に微力ながら貢献させていただければ幸いと存じます。

さらに、分析分野に関わる者として、長期的には、何か新しい原理に基づく分析法をまとめ上げ、皆様のお役に立てるこをめざしたいと思います。

引き続き、本誌のご愛読ならびに弊社に対します、ご指導、ご支援、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

◎ 株式会社日立ハイテクノロジーズ

北海道支店 札幌 (011) 707-3347
東北支店 仙台 (022) 264-2219
筑波支店 土浦 (029) 825-4801

本社(サポートセンタ) 東京 (03) 3504-7211
中部支店 名古屋 (052) 219-1881
関西支店 大阪 (06) 4807-2511
京都営業所 京都 (075) 241-1591

四国営業所 高松 (087) 814-9911
中国支店 広島 (082) 221-4511
九州支店 福岡 (092) 778-3005

分析機器に関する各種お問い合わせは…
お客様サポートセンタ 電話(03)3504-7211

受付時間 8:50~11:50 12:45~17:30(土・日・祝日および弊社休日を除く)

本ニュースは会員制情報検索サイト「S.I.nav」でもご覧になれます。
ご入会は無料ですので、下記URLにアクセスください。
<http://www.hitachi-hitec.com/sinavi/>

〈編集後記〉

関東地区では、今年は梅雨らしい天候の少ないまま、夏に突入しました。北海道でも、快適で見晴らしの良い気候が期待された洞爺湖地方の天候が、今年は不順でした。そのためか、これから世界の見通しが明瞭になることを期待したサミットも、霧に包まれたまま終了してしまいました。

一方、計量の世界では、各種のデータ改ざんが明らかにされ、分析値の信頼性に対する取り組みがより一層強化されてきています。本年4月に報告された経済産業省計量制度検討小委員会報告書では、「計量標準の整備・供給」の拡大・強化、「正確な計測・計量を担保する従事者の能力向上」の

必要性等が提言されました。

本誌も、分析化学のいろいろな断面の情報を提供することを通じて、正確な知識の習得、分析技術力の向上に貢献できることを願っています。より、お役に立つ情報誌として充実を図りますので、ご意見、ご要望等をお寄せいただきたく、お願ひいたします。

(望月 記)

■インターネットホームページ

URL : <http://www.hitachi-hitec.com/science/>

■本ニュースに関するお問い合わせは、右記、または、(株)日立ハイテクノロジーズの上記各事業所へご連絡ください。

○(株)日立ハイテクノロジーズ 事業管理部
〒105-8717 東京都港区西新橋1-24-14
電話(03)3504-7811 FAX(03)3504-7756

○(株)日立ハイテクノロジーズ

那珂アリケーションセンタ
〒312-0057 茨城県ひたちなか市石川町11-1
電話(029)354-1970(代)

HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

August, 2008 VOL. 51 No. 2

発行 2008年8月28日

編集人 望月 康平

発行人 岡田 務

発行 株式会社日立ハイテクノロジーズ

〒105-8717

東京都港区西新橋1-24-14

電話(03)3504-7811(ダイヤルイン)

印刷 日立インターメディックス株式会社