

2. 短報

目 次

1) LC/MS 測定におけるマトリックス効果とその低減	-----	(生活衛生)	--	123
2) マイクロウェーブ分解装置を用いた食品中の重金属分析	-----	(生活衛生)	--	127
3) 京都市中央卸売市場第一市場を流通する生食用鮮魚介類等の衛生状態について	--	(生活衛生)	--	132
4) リジン脱炭酸陰性の <i>Salmonella enteritidis</i> による食中毒事例について	-----	(臨 床)	--	134
5) 黒毛和種牛における横隔膜の脂肪置換症の二例	-----	(病 理)	--	136
6) 京都市と畜場における牛の胆汁及び肝臓のカンピロバクター汚染実態調査	-----	(病 理)	--	139
7) 黒毛和種牛における肝臓の増殖性好酸球性小葉間静脈炎を伴った肺病変	-----	(病 理)	--	141
8) 黒毛和種牛の脂肪壊死症に起因した閉塞性黄疸の1例	-----	(病 理)	--	143
9) 牛の月齢と歯列に関する調査	-----	(病 理)	--	146
10) 京都市感染症発生動向調査における小児科定点からの過去5年間の報告状況	----	(疫学情報)	--	151
11) 京都市の高齢者における生活状況についてー平成13年国民生活基礎調査よりー	-----	(疫学情報)	--	154
12) 京都市内の保健医療機関及び教育機関における受動喫煙防止対策について ー平成15年度公共施設等の受動喫煙防止対策実態調査からー	-----	(疫学情報)	--	159
13) 感音性難聴児におけるガスリーカードを使った原因検索の検討	-----	(調査研究)	--	165

Contents

1) Minimization of the matrix effect in LC/MS measurement	(Food)	-- 123
2) Analysis of trace elements in food using the microwave digestion	(Food)	-- 127
3) Sanitary condition of Raw Fishes available for Raw Consumption and others at the Central Wholesale Market of Kyoto city	(Food)	-- 132
4) A case of food- born disease by <i>Salmonella</i> Enteritidis with no activity of lysine decarboxylase	(Clin)	-- 134
5) Case report: Muscular steatosis of diaphragm in two Japanese Black cattle	(Path)	-- 136
6) Survey for <i>Campylobacter</i> contamination in the bovine bile and liver at the Kyoto City slaughterhouse	(Path)	-- 139
7) Pulmonary lesions associated with hepatic eosinophilic proliferative pylephlebitis in Japanese Black cattle	(Path)	-- 141
8) A case of obstructive jaundice induced by fat necrosis in Japanese Black cattle	(Path)	-- 143
9) Relationships between the age and the eruption of permanent teeth in cattle	(Path)	-- 146
10) Analysis of Reporting Data from Pediatric Sentinels in the Kyoto City Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases during 1999-2004	(Epid)	-- 151
11) Living conditions of aged people in Kyoto City:From Comprehensive Survey of Living Conditions of People on Health and Welfare 2001	(Epid)	-- 154
12) Prevention and countermeasures for passive smoking at the health medical institutions and the educational facilities in Kyoto City, 2003	(Epid)	-- 159
13) Sensorineural hearing loss in infants and young children ; Guthrie card studies	(Pub)	-- 165

LC/MS 測定におけるマトリックス効果とその低減

伴埜行則¹, 筒井達也¹, 橋本貴弘¹, 出口夫美子¹, 米田昌裕¹,
伴創一郎¹, 川勝剛志¹, 稲田眞之助¹, 永井博昭¹

Minimization of the matrix effect in LC/MS measurement

Yukinori BANNO, Tatsuya TSUTSUI, Takahiro HASHIMOTO, Fumiko DEGUCHI, Masahiro KOMEDA,
Souichirou BAN, Tsuyoshi KAWAKATSU, Shinnosuke INADA, Hiroaki NAGAI

Abstract : The matrix effect is problematic in an analysis with use of LC/MS, which prevents stability of measurement, by increasing or reducing the sensitivity of detection. In the measurement of chlorflazuron in beef, we noted that the fixed quantity value increased according to the matrix effect. We therefore cleaned up the specimens with a silica-gel -mini-column, which minimized the matrix effect and the assay sensitivity was brought to be normalized. In the determination of TBZ and Imazalil in citrus fruits or in chopsticks, quantity result was decreased. We solved the problem by diluting the sample aliquot prior to the measurement.

Key Words : 質量分析装置付き液体クロマトグラフィー LC/MS, マトリックス効果 matrix effect

I はじめに

食品分野での LC/MS の利用において、マトリックス効果がしばしば問題になる。マトリックス効果とは実サンプル中の目的化合物の感度が標準溶液と比較して増大したり減少したりする現象と定義されている。マトリックス効果は正確な定量の妨げとなるため、軽減させなければならない。しかし、マトリックス効果を引き起こす原因は様々で、通常複数の要因が複雑に関係している。そこで、当所で LC/MS を使って分析している各種試験について、マトリックス効果に対する対処法を検討した。

II 方法

1. 試料の前処理

1) 牛肉中のクロルフルアズロン

アセトン、ヘキサン混液で試料より脂肪を抽出し、脂肪量を測定する。脂肪 2 g 相当量をアセトニトリル分配し、脂肪を除去する。さらに、GPC システムにより、脂肪その他の生体成分と測定対象物質を分離する。この溶液を濃縮し LC/MS 用試験溶液とする。あるいは、GPC 精製液を濃縮し、シリカゲルカートリッジに負荷し、まず n-ヘキ

サン10ml, 5%酢酸エチル/n-ヘキサン10ml で有機塩素系農薬類を溶出させる。引き続き n-ヘキサン:アセトン(1:1)20ml でクロルフルアズロンを溶出させ、濃縮後 LC/MS 用試験溶液とする。

2) かんきつ類およびバナナ中の TBZ, イマザリル

アルカリ性下で酢酸エチル抽出後、SI-SCX ダブルカートリッジ (SI: シリカゲルカートリッジ, SCX: 強塩基性イオン交換カートリッジを連結させたもの)に通すと, DP, OPP は通過し, TBZ, イマザリルは SCX に吸着する。DP, OPP の分画は濃縮乾固後メタノール溶液にし, DP, OPP 用試験溶液とする。TBZ, イマザリルは SCX カートリッジにアンモニア含有メタノールを流し, 溶出させる。この溶出液を濃縮後 LC/MS 用試験溶液とする。

3) 割り箸中の防バイ剤

平成15年1月21日通知の「割り箸に係る監視指導について」の材質試験の方法によりメタノール抽出液を濃縮後 LC/MS 用試験溶液とする。

2. 測定条件

1) クロルフルアズロン

¹ 京都市衛生公害研究所 生活衛生部門

表1 クロルフルアズロンの測定条件

装置 LCQ-DECA
カラム InertsilODS-3 内径 2.1mm×長さ 150mm
移動相 0.5%酢酸水溶液(A)：アセトニトリル(B) 0分 B=50% 20分 B=90%(30分まで保持) 35分 B=50%(Post Run)
流速 0.2ml/min, カラム温度 40℃, 注入量 5 μ l
Scan Event Neg 540.0→446-592 MS/MS: Amp.23.0%, Q0.25, Time30.0, Isow2.0

2) TBZ, イマザリル

表2 TBZ, イマザリルの測定条件

装置 LCQ-DECA
カラム InertsilODS-3 内径 2.1mm×長さ 150mm
移動相 20mM 酢酸アモニウム水溶液(A)：アセトニトリル(B) 0分 B=10% 10分 B=100% 20分 B=100% 22分 B=10%(Post Run)
流速 0.2ml/min, カラム温度, 40℃注入量 5 μ l
Scan Event 1. Pos 80-350 2. Pos 202—80-250 MS/MS Amp36% 3. Pos 297—80-300 MS/MS Amp30%

Ⅲ 結果と考察

1. 牛肉中のクロルフルアズロン

脂肪抽出液をアセトニトリル分配後 GPC システムにより精製した溶液を測定した場合、マトリックス効果の影響が無視できない程大きく1.5倍以上の回収率となった(図1)。

増大する方向にマトリックス効果が見られる時は、LC部分の配管等に活性点がある場合が考えられる。標準測定時は、その活性点に目的化合物が吸着し、溶出量が減少するが、実サンプル測定時は、大量の夾雑物質が活性点に吸

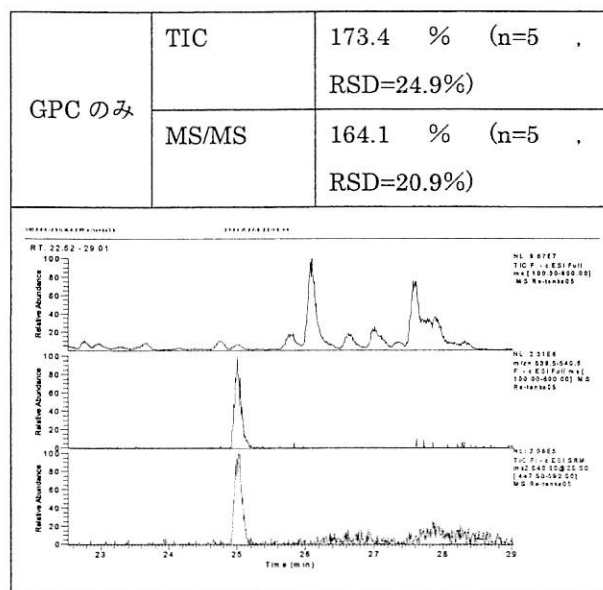


図1 GPC処理のみの添加試料(上からTIC,SIM,MS/MS)

着し目的化合物の吸着を妨げ、その結果溶出量が増大する¹⁾。今回はこのケースと考えられる。

マトリックス効果に対する対処法としてマトリックスマッチングさせた標準溶液で定量する方法がある。この時マトリックスの種類、濃度はどの程度一致させる必要があるのか検証する目的で以下の実験を行った。クロルフルアズロンを含まない牛肉を3検体処理し、GPC 精製後の試験溶液を調製した。それぞれの試験溶液を5%, 10%, 50%含む0.2ppmの標準溶液を調製し、マトリックスを含まない標準溶液とフルスキャン測定によるSIM及びMS/MS測定のピーク面積を比較した。

マトリックス成分量とマトリックス効果による感度上昇比との相関係数を算出したところ、SIMで0.91, MS/MSで0.98の正の相関が認められた。(図2参照)

5%のマトリックス量の試験溶液では、サンプルが違っているとマトリックス効果の大きさに2倍近い差が見られるが、50%のマトリックス量ではサンプルによる差も、測定方法による差も小さくなった。再現性のあるマトリックス効果の大きさを実現させるためには、ある程度のマトリックスの量が必要ことが示唆された。実際の試料の測定時には各試料中のマトリックス量を揃える事は難しく、マトリックスマッチングによる定量値の補正は、あまり実際的でないと思われた。

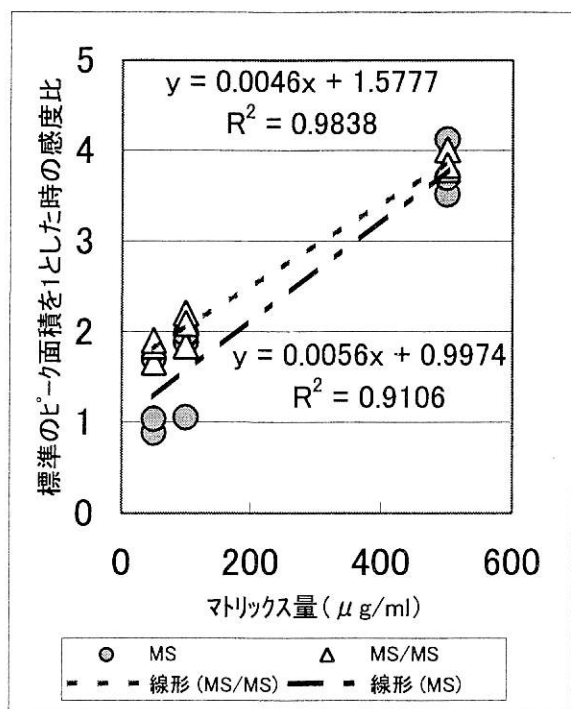
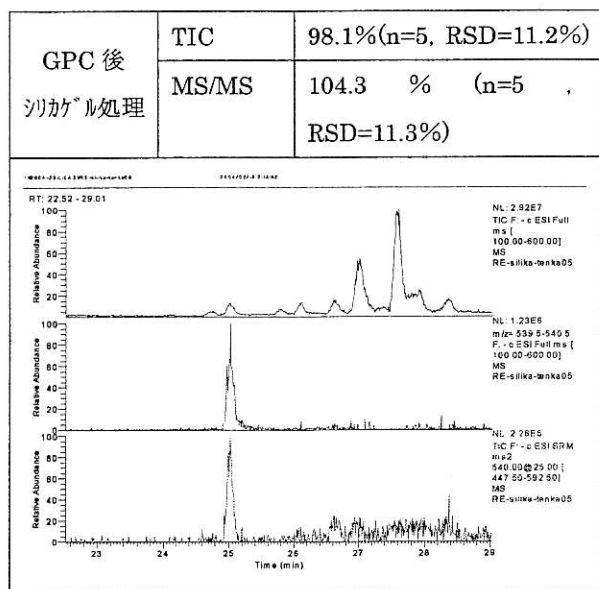


図2 標準溶液を1とした時の感度比とマトリックス量の関係

図3 GPC処理後にシリカゲル処理した添加試料
(上からTIC, SIM, MS/MS)

従って、マトリックスの量を減らす有効な精製法がある場合は、まず試験溶液の精製を検討することが必要と思われる。GPC 精製後の試験溶液をさらにシリカゲルカートリッジで精製したところ、試験溶液はほぼ100%の回収率となり、マトリックス効果の影響を抑える事ができた(図3)。

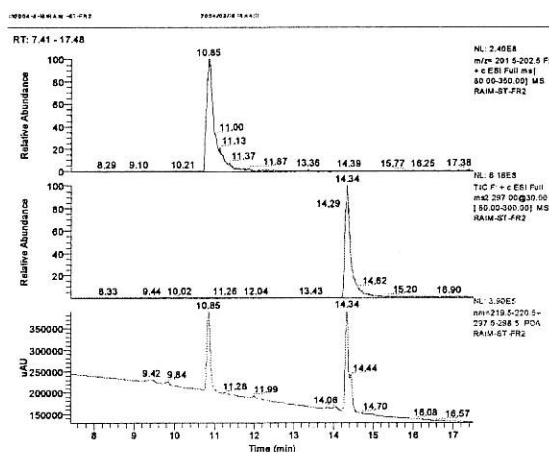
2. ライム中および割り箸中のTBZ, イマザリル

ライム中の TBZ, イマザリルを PDA と MS で定量した時、それぞれの検出器による回収率は表3のように、PDAの回収率がほぼ100%であるのに対し、MS による定量値は50%前後となった。この場合のマトリックス効果は牛肉中のクロルフルアズロンの場合と異なり、負の方向に働いたといえる。一般に LC/MS におけるイオン化の過程はイオン化効率の高い成分が優先的にイオン化される競争反応であり、大量の夾雑物質中にイオン化効率の高い成分が含まれていると感度が低下すると言われている¹⁾。今回はこのケースと考えられる。

表3 ライム中のイマザリル, TBZの添加回収率

化合物名	測定方法	回収率(%)
TBZ	PDA	101.1
	LC/MS	43.5
イマザリル	PDA	86.7
	LC/MS	54.6

しかし、図4に示すとおり、ライムの試験溶液は十分な精製効果により、妨害ピークも見られない良好なクロマトグラムが得られた。従って精製処理をさらに施しても、マトリックス効果に対する劇的な効果は期待できないと思われる。

図4 イマザリルとTBZを検出したライムのクロマトグラム
(上からSIMによるTBZ, MSMSによるイマザリル, PDA)

PDA の検量線は0.1ppm から10ppm の範囲で良好な直線が得られるのに対し、LC/MS 測定では0.1ppm を超えると曲がり始め、0.001ppm から0.1ppm の範囲で良好な直線が得られた。図5, 6にイマザリル, 図7, 8に TBZ の検量線を示した。

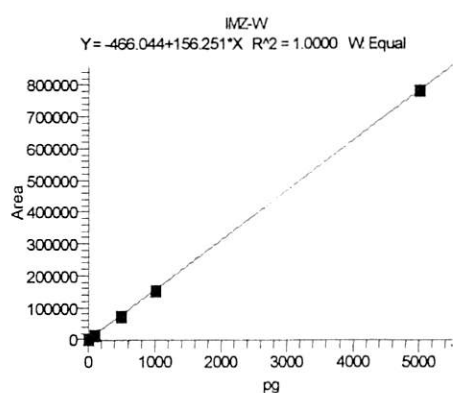


図5 イマザリルのPDA測定による検量線

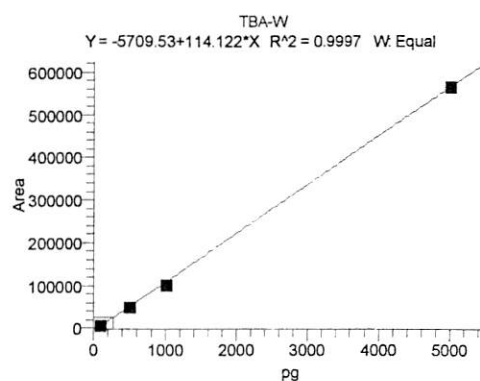


図7 TBZのPDA測定による検量線

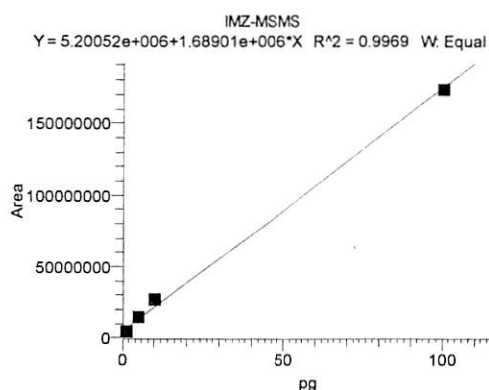


図6 イマザリルのLC/MS測定による検量線

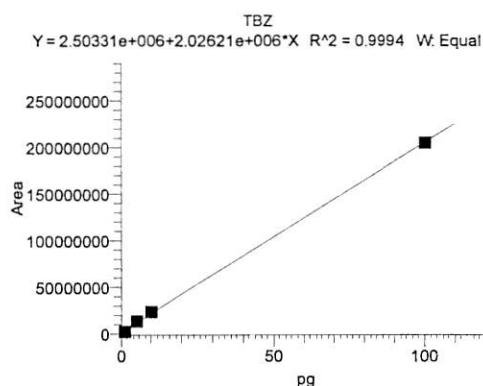


図8 TBZのLC/MS測定による検量線

今回のマトリックス効果に対する対処法は、単純に希釈して測定することが考えられる。割り箸中の坊バイ剤の材質試験において、測定値が0.1ppm になるように添加回収試験溶液を希釈して測定した時の結果は、表4のようになった。PDA 測定、LC/MS 測定ともに良好な結果となった。

表4 割り箸(4種類)の材質試験における添加回収率

化合物名	測定方法	回収率(4種類の平均)
TBZ	PDA	93.3%
	LS/MS	98.5%
イマザリル	PDA	92.4%
	LC/MS	96.3%

Ⅳ まとめ

LC/MS を用いた分析においてもマトリックス効果には感度を増大させる場合と、減少させる場合がある。どちらの場合も正確な定量の妨げとなるためマトリックス効果の低減化を図る必要がある。その方法は分析法に応じて検討しなければならない。牛肉中のクロルフルアズロンの測定では、シリカゲルカートリッジによる精製で原因となる夾雑物質の量を減らすことで、マトリックス効果の低減化が図れた。かんきつ類中及び割り箸中の TBZ, イマザリルの測定では、試験溶液の希釈率を検討することでマトリックス効果の低減化が図れた。

Ⅴ 文献

- 1) 中村洋監修「液クロの巻」筑波出版会