総説

LC/MS と食品分析

岡 尚男^{*,†} 伊藤 裕子^{*} 猪飼 誉友^{*}

Use of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry in Food Analysis

Hisao Oka[†], Yuko Ito and Yoshitomo Ika^{*}(Aichi Prefectural Institute of Public Health: 7-6, Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya 462-8576, Japan; [†]Corresponding author)

1. はじめに

混合物を分離する手段としては、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は非常に優れた手法であるが、一般的にはその検出部に UV あるいは蛍光検出器が用いられている。したがって、分析対象物質に関する情報はクロマトグラム上のピークの保持時間のみであり、食品など多くのマトリックスを含む試料の分析には、十分な同定能力を有しているとは言いにくい。一方、質量分析法 (MS) は、分析対象物質の構造に関する情報が豊富に得られることから、同定などの目的には優れた分析法であるが、適用する試料には単一成分であることが要求される。この HPLC と MS を結合することにより、それぞれの弱点が補われ、分離能力にも同定能力にも優れた分析手法、液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) が実現する。この手法は、古くからその有用性が認識されていたにもかかわらず、液体クロマトグラフと質量分析計とを結合するためのインターフェースの開発が難しく、実用化されるまでに長い時間を要した。しかし、最近になってようやく実用機が市販されるようになり、食品分析にも使われるようになってきた。本稿では、この LC/MS について概説するとともに、LC/MS の食品分析への応用例を紹介する。なお、詳しくは数々の総説^{1)~3)} や成書^{4)~6)} が出版されているので、そちらを参照していただきたい。

2. 液体クロマトグラフィー/質量分析法

2.1 得られる情報

図 1 に概略図を示した LC/MS は、液体クロマトグラフで分離した試料を直接質量分析計に導入して質量分析を行うものであり、HPLC の高い分離能と MS の優れた構造解析能力を兼ね備えた分析手法である。

LC/MS では、LC カラムから溶出される物質のマススペクトルを連続的に測定しており、得られたデータをコンピューターで処理することにより、任意の保持時間におけるマススペクトル、任意のイオンの時間的変化を記録した

マスキロマトグラム及び 1 回ごとの測定で検出された総イオン量の時間的変化を記録したトータルイオンクロマトグラムなど目的に応じた形で取り出すことができる。マススペクトルは、目的成分の構造解析や同定・確認に有用であり、マスキロマトグラムは目的成分の検索に、また、トータルイオンクロマトグラムはデータの全体像の把握にそれぞれ使うことができる。また、選択イオン検出法 (Selected Ion Monitoring, SIM) と呼ばれる測定手法がある。この方法は、目的化合物由来のイオンを測定前に選択し、そのイオンのみの強度を連続的に記録し、クロマトグラム (選択イオン検出プロファイル) を得る方法であり、一見するとマスキロマトグラムと同じである。しかし、SIM は目的化合物由来のイオンを検出するためだけに質量分析部が使われるため、マスキロマトグラフィーの 10~100 倍の検出感度を得ることができる。したがって、精度の高い高感度定性定量分析が可能になる。

図 2 に示すように質量分析部に分析管を 2 本直列に配置した装置を用いる液体クロマトグラフィー/タンデムマ

図 1. 液体クロマトグラフィー/質量分析法の概略図

図 2. LC/MS/MS の概念図

[†] 連絡先:^{*} 愛知県衛生研究所: 〒462-8576 名古屋市北区辻町流 7-6

図4. APCIの基本原理図

合物の分析には不向きで、更に、ESIのような多価イオンの生成も期待できない。しかし、ESIではイオン化できないような分子量1,000以下のアミノ酸、ステロイド、アルカロイド、ヌクレオシド、抗生物質、糖、ビタミン、ペプチド、農薬などの低極性、中極性化合物の分析に適し、ESIよりもフラグメントイオンが多い。

質量分析部は、磁場型、四重極型、イオントラップ型、飛行時間型などがあり、それぞれ特徴があるので、目的によって使い分けられている。磁場型は、イオンの精密質量を測定することができるので、イオンの元素組成を決定することができるが、装置が大型で、高価である。飛行時間型は、理論的には質量の測定範囲に制限はなく、分子量の大きな化合物の測定に向いているが、分解能はやや低い。一方、四重極型及びイオントラップ型は磁場型のように精密質量を測定することはできないが、扱いやすく比較的安価であるために、現在のところLC/MS装置に最も多く用いられている。

四重極型質量分析計は、平行な4本の電極に直流と高周波を重ね合わせた電圧をかけて電場を作り、イオンを質量/電荷(m/z)に従って分離する。イオン源より四重極に導かれたイオンは、高周波電場中を振動しながら進み、特定の m/z に対応したイオンのみが安定な振動をして検出器に到達し、検出される。ほかのイオンは振動が大きくなり電極に衝突し、検出器まで到達しない。電圧を徐々に変化させることにより、質量分離が可能となる。

イオントラップ型は、ドーナツ状のリング電極とこれを塞ぐような形の一對のエンドキャップ電極からなり、これらに交流電圧をかけることにより、電極の間にイオンは振動しながら閉じこめられる。その後、電圧を変化させることにより、イオンを放出し、質量分離する。上述の四重極型では特定の m/z に対応したイオンのみが安定な振動をして検出器に到達し検出されるが、ほかのイオンは振動が大きくなり電極に衝突し、検出器まで到達しない。しかし、イオントラップ型は安定な振動を示すイオンはすべて電極間に封じ込められ、不安定な振動を示すイオンのみが電極から放出され、検出器に到達する。したがって、電極にかけられた電圧を徐々に変化することにより、質量分離が可能となる。また、イオントラップ型は特定のイオンを電極間に封じ込め、衝突解離を繰り返し起こすことができるので、装置を2台結合することなく、すなわち、1台のイオントラップ型質量分析計でタンデムマスペクトロメ

トリーが実施可能である。

イオン検出部には、二次電子増倍管、アレー検出器、光電子増倍管、高感度変換ダイノード検出器などが用いられている。

3. 食品分析への応用

表1に1994年以降に発表されたLC/MSの食品分析への応用に関する主な報告を、そして、以下にこれらの報告の傾向についてまとめるとともに、代表的な応用例を紹介する。表1からも明らかのように、畜産物中に残留する動物用医薬品の定量や確認法に関する報告が半数近くを占めて最も多く、次いで天然有毒成分に関する報告が多い。これらの物質のほとんどは、もっぱらHPLCで分析が行われてきたが、これまで有効な確認法や高感度測定法がないという問題を抱えていた。しかし、最近のLC/MSの高感度化、高性能化に伴い、これらの分析がLC/MSにより可能となったことによるもので、今後、これらに関する報告はますます増えるであろうと予想される。その他の測定物質として、残留農薬、天然色素、天然抗酸化物質、ビタミンや油脂、更に、最近問題となっている内分泌かく乱化学物質などの分析への応用例が報告されており、適用対象物質がしだいに広がっていることが分かる。用いられているインターフェースは、ESIが圧倒的に多く、次いでAPCIであった。TSPやFrit-FABはわずかに1, 2報しかみられず、数年前まで主流であったTSP, Frit-FAB, PBからESI及びAPCIへと世代交代しつつあることがうかがえる。また、使用される質量分析計は、シングルステージの装置からタンデムマスペクトルが測定可能なトリプルステージの装置の使用が目立ち始め、それに伴い、定量分析の測定モードも以前は、SIMが主流だったのに対し、最近では更に信頼性の高い分析が可能なSRMに移行しつつある。LC分離については、ほとんどの報告でシリカベースの逆相系カラムが用いられているが、ポリマーベースのカラムやマイクロボアのカラムの使用など、新しい試みが目立つ。検出限界については、前処理の方法などにも影響されるため単純に比較はできないが、ほとんどがppbレベル、なかには1ppbをも下まわっているものもあり、これらは汎用の検出器のそれと比べて勝るとも劣らない値である。

試料の前処理法については、溶媒抽出、液-液分配、プレバックカートリッジ処理、ゲルろ過などが主流であり、他の分析手法を適用する場合との違いは見当たらない。しかし、LC/MSの場合、カラムからの溶出液は質量分析計に導入されるため、高濃度の塩類や有機物が存在すると、それらは細い流路に析出したり、装置を汚染してゴーストピークの出現や感度低下を招くなど、様々なトラブルの原因となる。したがって、このようなことを念頭においたうえで、前処理法が選択されている。

一般的にLC/MSでは、不揮発性の酸、塩基、塩を含んだ移動相を使用することはできない。そこで、従来はメタ

表 1. LC/MS の食品分析への応用例

分析対象化合物	試料	前処理	HPLC 条件 (固定相/移動相)	装置/定量法	検出限界	文献
テトラサイクリン系抗生物質 4 種	牛組織	SPE (PS-2)	Baker C8/メタノール-アセトニトリル-シユウ酸	APCI/MS/MS/SRM	1~4 ng/g	10
テトラサイクリン系抗生物質 4 種	牛組織	SPE (C18)	TSK gel Super-Octyl/アセトニトリル-トリフロロ酢酸	ESI/MS/MS		11
テトラサイクリン系抗生物質 4 種	ハチミツ	マキルベイン緩衝液, 抽出, SPE (C18)	Inertsil Ph/メタノール-アセトニトリル-トリフロロ酢酸	Frit-FAB	0.1 ppm	12
ベータラクタム系抗生物質 6 種	牛腎臓, 肝臓, 肉	SPE (C18+SAX)	TSK gel 80Ts/アセトニトリル-水-ジブチルアミン	ESI/MS/MS	20~30 ng/g	13
ベータラクタム系抗生物質 4 種	牛腎臓, 肝臓, 肉	液-液分配, SPE	メタノール-酢酸アンモニウム	ESI/SIM	15~100 ng/g	14
ベータラクタム系抗生物質 6 種	牛乳	除タンパク, SPE (C18)	YMC basic column/メタノール-ギ酸 (グラジエント溶出)	ESI/MS/MS	5~10 ng/mL	15
ベータラクタム系抗生物質 5 種	筋肉, 腎臓, 乳	アセトニトリル抽出, 液-液分配	Intersil ODS-2/メタノール-アセトニトリル-テトラエチル	ESI/SIM	2~100 ng/g	16
ベータラクタム系抗生物質 6 種	牛乳	限外ろ過	Porous II R/アセトニトリル-トリフロロ酢酸-ギ酸, アセトニトリル-ヘプタフルオロ酪酸-ギ酸	ESI/SIM	10 ppb	17
ベータラクタム系抗生物質 6 種	牛乳	限外ろ過	Ultremex C18/アセトニトリル-酢酸	ESI	200 pg/ μ L	18
エリスロマイシン, オレアンドマイシン	肉, 魚	SPE (Oasis HLB)	TSK gel ODS/80Ts/アセトニトリル-酢酸	ESI/SIM	0.01 μ g/g	19
スベクチノマイシン	乳	除タンパク, SPE (C18)	PLRP-S/メタノール-水-ヘプタフルオロ酪酸	ESI/MS/MS		20
セフトオフル	乳	除タンパク	ヘプタフルオロ酪酸-酢酸-アセトニトリル, プロピオン酸/2-プロパノール (ボストカラム)	APCI/SIM		21
エブリノメクチン	牛肝臓	メタノール抽出	Abzelute Guard disc+ODS-DB/アセトニトリル-酢酸	ESI/MS/MS	<2,400 ng/g	22
ラサロシド	卵	アセトニトリル抽出, 液-液分配	Intersil ODS-2/アセトニトリル-メタノール-テトラヒドロフラン-トリフロロ酢酸	ESI/SIM	0.5 ng/g	23
サラフロキサシン	ナズマ組織	アセトニトリル抽出, SPE (C18)	YMC-PACK ODS-A/アセトニトリル-酢酸アンモニウム	IS/SRM	0.2 μ g/g	24
ポリエーテル系抗生物質 3 種	鶏筋肉, 肝臓, 卵	ヘキサントルエン抽出	Inertsil C18/アセトニトリル-メタノール-テトラヒドロフラン-トリフロロ酢酸	ESI/SIM	1 ng/g	25
キノロン系抗菌剤 4 種	ナズマ筋肉	溶媒抽出	NSI/アセトニトリル-テトラヒドロフラン-酢酸	APCI/SRM	0.08~0.16 ppb	26
アミノグリコシド系抗生物質 6 種	牛腎臓	MSPD (CN)	Spherisorb ODS-2/アセトニトリル-ベンゼン-プロピオン酸	IS/SRM	0.02~0.5 ppm	27
キノロン系抗菌剤 15 種	乳, サケ	除タンパク, 液-液分配	phenyl 又は ODS-AQ/水-アセトニトリル-ギ酸	ESI/MS/MS	1 ppb	28

表 1. つづき

分析対象化合物	試料	前処理	HPLC 条件 (固定相/移動相)	装置/定量法	検出限界	文献
フラゾリドン	豚肉, 肝臓	水-メタノール抽出, 誘導体化, 酢酸エチル抽出	LiChrospher RP18/酢酸アンモニウム-アセトニトリル	TSP-SIM	0.2~0.5 ng/g	29
サルファ剤 4 種	豚筋肉	SPE (NH ₂ + SCX)	Novapak C18/メタノール-アセトニトリル-酢酸アンモニウム	ESI/SRM	0.8 µg/g	30
ニトロイミダゾール系寄生虫駆除剤 3 種	鶏肉	液-液分配	C18/メタノール-アセトニトリル-ギ酸	ESI/SIM	1~4 ng/g	31
クレンブテロール	肉, 肝臓	SPE (C18 + SCX)		ESI/MS/MS/MS/MS	0.4 ng/g	32
成長ホルモン剤 7 種	牛筋肉, 肝臓	SPE	Supelcosil/メタノール-アセトニトリル-ギ酸アンモニウム	APCI/SIM	10~100 ppb	33
アバメクチン	柑橘類	MSPD	Kromasil C18/メタノール-水	ESI/SIM	2.5 ng/g	34
農薬 8 種	リンゴ, ナシ	液-液抽出	Nucleosil C18/アセトニトリル-ギ酸アンモニウム (グラジエント溶出)	ESI/SIM	0.01~0.02 mg/kg	35
ジフルベンズロン	マッシュルーム	アセトン抽出, ゲルろ過	Hichrom S50DS2/メタノール-水	APCI/SIM	0.017 mg/kg	36
カーバメート系農薬 11 種	果実, 野菜	メタノール抽出, 液-液分配, 活性炭カラム	Zorbax C8/アセトニトリル-ギ酸	APCI	10~100 ppb	37
らん藻毒 5 種	魚	液-液分配, SPE	PLRP-S column/メタノール-ギ酸	IS/SIM	1~15 ng/g	38
バツリン	リンゴジュース, パン	液-液分配, SPE	Nucleosil PR 18/アセトニトリル-水 (グラジエント溶出)	ESI/SIM	20.3 µg/L	39
シガトキシン類	魚		Vydac TP52/アセトニトリル-水-トリフロロ酢酸 (グラジエント溶出)	APCI/MS/MS	40~200 ppt	40
アフラトキシン	イチジク, ピーナッツ	メタノール抽出, セルロース+シリカゲルカラム	Spherisorb 5 ODS-1/水-アセトニトリル-メタノール	APCI/MS/MS		41
ベクテノトキシン 2 種	ホタテ	SPE (C18), 液-液分配	Mightysil RP-18/アセトニトリル-水-酢酸	ESI		42
下痢性貝毒 4 種	貝	メタノール-水抽出, 液-液分配, SPE (NH ₂)	Vydac 201TP ODS, Vydac 214TP C4/メタノール-トリフロロ酢酸	IS/SIM	1 ng/g	43
フモニシン B1 B2 B3	コーンミール	アセトニトリル-水抽出, SPE (C18)	NS1/アセトニトリル-酢酸アンモニウム	ESI/SIM	20~100 ppb	44
フモニシン B1 B2	コーン	メタノール-水抽出, SPE (SAX)	LiChrospher 60-RP select B/メタノール-トリフロロ酢酸	ESI/SRM	0.8 ng/g	45
カロテノイド類 5 種	野菜ジュース		Pront Sil silica gel (triacyltetrachlorosilane 処理済)/メタノール-MBE	APCI/MS/SIM	1 pmol (beta-carotene)	46

表 1. つづき

分析対象化合物	試料	前処理	HPLC 条件 (固定相/移動相)	装置/定量法	検出限界	文献
カロテノイド化合物 5 種	スイートポテト		C30 逆相カラム/メタノール-MBE-酢酸アンモニウム, メタノール-MBE-ヘプタフルオロ酪酸	ESI	1~2 pmol	47
クチナシ黄色素	生めん, 乳飲料	アセトン抽出, SPE (C18)	Nucleosil 5C18/アセトニトリル-水	ESI		48
アントシアニン	フルーツジュース, 野菜エキス	アセトン抽出, 液-液分配, SPE (C18)	Supelcosil LC-18/アセトニトリル-リン酸-酢酸 (グラジエント溶出)	ESI/MS/MS		49
プロアントシアニン類	食品, 飲料	SPE (C18)	Phenomenex Luna silica/ジクロロメタン-メタノール-50% 酢酸	ESI/MS		50
ラック色素	ゼリー	SPE (C18)	LiChrosorb PR-18/アセチルアセトン含有アセトニトリル-リフロロ酢酸	ESI/MS/MS		51
ビスフェノール A	缶飲料	SPE (C18+SCX+SAX)	Zorbax XDB-C18/酢酸-アセトニトリル	ESI/SIM	0.5~2 ng/mL	52
オクチルフェノール, ビスフェノール A	魚	MASE, SPE		APCI	10~50 ng/g	53
ゲニステイン, ダイゼイン	ベビーフード, 大豆粉		Microbore Primesphere 5C8/水-アセトニトリル-酢酸 (グラジエント溶出)	ESI/microbore	0.2~0.7 mg/kg	54
イソフラボン配糖体	大豆食品	メタノール-水抽出	Aquapore C8/アセトニトリル-酢酸アンモニウム	ESI, APCI, ISP		55
チアミン	ドラッグストア	液-液分配	CAPCELL PAK C18/アセトニトリル-酢酸アンモニウム	APCI	2 ng	56
トリアシルグリセロール類	魚油	酵素処理, フロリジルカラム	ODS-Hypersil/アセトニトリル-アセトン	Frit-FAB		57
天然抗酸化化合物 19 種	ローズマリー等	メタノール抽出, 液-液分配	Lichrosorb C18, Hypersil ODS/アセトニトリル-メタノール-酢酸	APCI		58
フェノール類, アルデヒド類	食物繊維	メタノール抽出, 加水分解	Nova-Pak Ph/メタノール-酢酸-ヨウ化テトラエチルアンモニウム	ESI	1.0~6.2 pg/inj	59
n-ニトロソジアシルアミン類 6 種	ビール	液-液分配	μ -Bondapak C18/アセトニトリル-水	ESI	2~6 ng	60
ヘテロサイクリックアミン酸	牛組織	SPE (PRS, C18)	ODS Hypersil C18/アセトニトリル-酢酸アンモニウム	ESI	1~6 ng/g	61

MBE, methyl *tert*-butyl ether; SPE, supercritical fluid extraction; PRS, propylsulfonic acid; SCX, strong cation exchange; SAX, strong anion exchange; SPE, solid-phase extraction; MSPD, matrix solid-phase dispersion; MASE, microwave-assisted solvent extraction; APCI, atmospheric chemical ionization; ESI, electrospray ionization; SIM, selected ion monitoring; SRM, selected reaction monitoring; ISP, ion spray; TSP, thermospray; Frit-FAB, Frit-first atom bombardment; MRM, multiple reaction monitoring

ノール-水あるいはアセトニトリル-水の混液に、ギ酸 (0.5% 以下)、酢酸 (2% 以下)、トリフルオロ酢酸 (TFA, 0.2% 以下)、酢酸アンモニウム及びギ酸アンモニウム (0.03 mol/L 以下) を添加したものが使用されてきた。しかし、最近では LC による高分解能な分離が要求され始めたので、ジブチルアミンアセテート、ペンタフルオロプロピオン酸、ヘプタフルオロ酪酸といった揮発性のイオンペア試薬が使用され、ベータラクタム系¹³⁾ やアミノグリコシド系²⁷⁾ の抗生物質、カロテノイド系の天然色素⁴⁷⁾ の分析に応用されている。しかし、これらのイオンペア試薬は、LC/MS の配管部分に残留することがあり、その使用には注意が必要である。

3.1 動物用医薬品

3.1.1 抗生物質

上述のように、畜産物中に残留する動物用医薬品、特に残留抗生物質分析への応用例が目立つ。

オキシテトラサイクリン (OTC), テトラサイクリン (TC), クロルテトラサイクリン (CTC), ドキシサイクリン

図 5. テトラサイクリン系抗生物質

(DC) に代表されるテトラサイクリン系抗生物質 (TCs, 図 5) は、動物用に使用される抗生物質の中で最も使用量の多い医薬品であることから、従来より、様々な手法を用いた分析法が検討されてきた。TCs は難揮発性であることから、LC/MS が検出感度あるいは信頼性の点から最も適した方法であると考えられたが、TCs が二価の金属イオンとキレートを作りやすく、LC カラム中の金属イオンと結合し、テーリングを起こしやすい。したがって、これを防ぐために移動相中に不揮発性の酸であるシュウ酸を添加し、HPLC による分析が行われている⁹⁾。上述のように、不揮発性の化合物を移動相に混入するとイオン源や質量分析管の汚染や目詰まりを起こしやすく、使用することはできない。そこで、金属イオンを極限まで除去した高純度シリカゲルより製造された化学結合型のカラムと、揮発性のトリフルオロ酢酸を含んだ移動相を用いることにより、テーリングすることなく、良好な分離が得られた。そこで、フェニルタイプの化学結合型のカラムとトリフルオロ酢酸を含んだ移動相を用い、はちみつ中の TCs の同定が Frit-FAB LC/MS により実施された¹²⁾。更に、この手法は ESI LC/MS/MS に応用され、腎臓及び肝臓を含む牛組織中の同定に用いられた¹¹⁾。得られた TCs のタンデムマススペクトルには、 $[M+H]^+$, $[M+H-NH_3]^+$, $[M+H-NH_3-H_2O]^+$ が明瞭に観察され、0.1 ppm レベルの同定が可能であった (図 6)。更に、定量も試みられたが、TCs と牛組織由来の夾雑物質との分離が不十分であり、良好な結果は得られなかった。そこで、再度移動相へのシュウ酸の検討されたが、前述のように不揮発性のシュウ酸を ESI に使用することは目詰まりを発生させる危険性があり、避ける必要がある。しかし、シュウ酸は 200°C 以上に加熱すると水と炭酸ガスに分解されるので、これを利用してイオン源を高温に加熱してイオン化する APCI

図 6. 牛肝臓に 0.1 ppm の濃度で添加された TCs のタンデムマススペクトル

A) オキシテトラサイクリン, B) テトラサイクリン
C) クロルテトラサイクリン, D) ドキシサイクリン

図7. 豚腎臓中残留オキシテトラサイクリンのAPCI選択反応検出法による分析

- A) トータルイオンクロマトグラム
 B) オキシテトラサイクリンの選択反応検出プロファイル
 C) 内標準物質として添加したデメクロサイクリンの選択反応検出プロファイル (エルゼビア社の許可を得て、文献10より転載)

LC/MS/MS (SRM) による測定が試みられた。すなわち、イオン源のネプライザー温度を 475℃ に加温すれば、シュウ酸はイオン源中で分解し、目詰まりあるいは汚染といった不都合を生じることなく分析が可能となった¹⁰⁾。表1に示す条件により残留 TCs を良好に定量することができ、実際に豚腎臓中に 0.32 ppm の濃度で残留した OTC の定量に応用している (図7)。なお、この際に内標準物質としてデメクロサイクリンを用いているが、これの使用により分析精度が大幅に改良されている。この原因は試料由来の夾雑物質によるイオン化効率の抑制、あるいは MS/MS 条件のばらつきを内標準物質が補正しているためと考えられる。

ベータラクタム系抗生物質も上記の TCs と同様に使用量の多い医薬品であることから、従来より、様々な手法を用いた分析法が検討されてきた。

アモキシシリン、セファピリン、ペニシリン G、アンピシリン、クロキサシリン、セフトオフルの牛乳中の同定法の検討が ESI LC/MS により、行われている^{17), 18)}。これらの方法はいずれも限外ろ過膜を用いて除タンパクを行い、LC/MS を測定しているが、検出限界は 10~100 ppb

図8. ペニシリン系抗生物質

$[M-H-141]^-$

ペニシリン	[M-H] ⁻	[M-H-CO ₂] ⁻	[M-H-141] ⁻
PCG	333	289	192
PCV	349	305	208
MIPIC	400	356	259
MCIPC	434	390	293
NFPC	413	369	272
MDIPC	468	424	327

(m/z)

図9. ペニシリン系抗生物質のプロダクトイオンブレイクサーイオン: $[M-H]^-$

と推定され、ペニシリン G の MRL (maximum residue limits: 最大残留基準, 牛乳: 4 ppb) での同定は難しいようである。一方、ESI LC/MS を用いた畜産動物組織中の分析法としては、Blanchflower らの報告がある¹⁶⁾。対象ベータラクタム系抗生物質としては、ペニシリン V、ペニシリン G、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリンを選択し、ナフシリンを内標準物質として使用している。移動相はトリエチルアミンを含んだアセトニトリル、水混液を用いている。SIM のモニターイオンとして、ペニシリン G は m/z 208 に現れるフラグメントイオンが選択されているが、他は脱プロトン化分子 ($[M-H]^-$) が用いられている。試料精製法はアセトニトリル抽出とそれの伴うアセトニトリル-*n*-ヘキサン分配によって実施されている。検出限界は化合物によって異なるが、25~100 ppb であった。

一方、ESI LC/MS/MS による 6 種のベータラクタム系抗生物質 (ペニシリン V、ペニシリン G、オキサシリン、クロキサシリン、ナフシリン、ジクロキサシリン、図8) の畜産動物組織中の同定法が検討されている¹³⁾。こ

これらの抗生物質は非常に極性が強く、良好に分離するためには移動相ヘイオンペア試薬の添加が必要であった。そこで、揮発性を有し、かつ酸性化合物に対して有効であるイオンペア試薬について検討したところ、ジブチルアミンアセテート (DBA-A) が 6 種類のベータラクタム系抗生物質の完全な分離と良好なイオン化効率を示し、更に、これをグラジエント溶出することによりジクロキサシリンとナフシリンの検出感度が向上した。次にプリカーサーイオンに、 $[M-H]^-$ を用いて MS/MS を測定したところ、図 9 に示すように 6 種すべてのベータラクタム系抗生物質から $[M-H]^-$, $[M-H-CO_2]^-$, $[M-H-141]^-$ の 3 種のプロダクトイオンが観察された。そこで、これらのイオンを用いて同定することとし、図 10 には、6 種のベータラクタム系抗生物質それぞれの濃度が 0.125 ppm である混合標準溶液を分析したときに得られるプロダクトイオンのうち、 $[M-H-141]^-$ をモニターしたクロマトグラム (選択反応検出プロファイル) を示した。試料からのベータラクタム系抗生物質の抽出は、必要に応じて除タンパク剤を

添加した食塩水を用い、C18 及び強陰イオン交換カートリッジにより精製され、LC/MS/MS 分析に供される。図 11 に豚肉に 0.05 ppm となるように添加し、得られた 6 種類のベータラクタム系抗生物質のタンデムマススペクトルを示したが、それぞれは標準のマススペクトルと完全に一致している。本法の検出限界は 0.02~0.03 ppm とされ、MRL レベルの同定が可能である。

エリスロマイシン (EM) 及びオレアンドマイシン (OL) は 14 員環マクロライド系抗生物質で、動物用医薬品として汎用されている。抗生物質の残留分析法は通常 HPLC-UV を用いて実施されることが多いが、EM 及び OL は短波長領域にしか UV 吸収がないことから、測定波長に 210 nm が用いられる。しかし、夾雑成分の多い畜水産物の分析に短波長領域を検出波長に用いることは、極めて難しい。そこで、ESI LC/MS による方法が開発されている¹⁹⁾。カラムに C18 を、移動相に 0.1% 酢酸-アセトニトリル (65:35) を用い、流速は 0.2 mL/min に設定された。SIM のモニターイオンは両抗生物質共にプロトン化分子 (EM: m/z 734, OL: m/z 688) が用いられた。移動相中の酢酸の濃度は低いほど、検出感度は高くなる傾向が認められたが、酢酸を 0.1% の濃度で含んだときに、最も良好な分離を示したので、上記の移動相が採用されている。畜水産食品中の EM 及び OL は 0.1% メタリン酸-メタノール溶液で抽出し、OASIS HLB カートリッジで精製された。0.2 ppm 添加時の回収率は 79.4~95.4%, 変動係数は 6% 以下と良好な結果であった。定量限界は 0.01 ppm であった。

牛腎臓中の 6 種類のアミノグリコシド系抗生物質 (ストレプトマイシン, ジヒドロストレプトマイシン, ネオマイシン B, ゲンタマイシン C, スペクチノマイシン, ハイグロマイシン B) の ISP LC/MS/MS による同定法が検討されている²⁷⁾。カラムに C18 を、移動相にはイオンペア試薬としてペンタフロロプロピオン酸を 20 mmol/L 含んだアセトニトリル-水混液を用い、グラジエント溶出法により分離された。SRM のモニターイオンにはそれぞれの化合物に対して最も強度の強いプロダクトイオンが選択

図 10. ペニシリン系抗生物質の選択反応検出プロファイル
モニターイオン: $[M-H-141]^-$

図 11. 豚肉に 0.05 ppm の濃度で添加されたペニシリン系抗生物質のタンデムマススペクトル

されている。試料からの抽出精製にはシアノプロピルシリル化シリカゲルを用いたマトリックス固相分散法が用いられている。

モノニン、サリノマイシンに代表されるポリエーテル系抗生物質も上記の2つの抗生物質と同様に適当な発色団を有していないので、その検出には困難が伴う。通常のHPLC分析による場合は蛍光誘導体化されることが多いが、より信頼性の高い分析法としてはLC/MSの利用がよい²⁵⁾。鶏肉、肝臓、卵中のモノニン、サリノマイシン、ナラシンのESI LC/MSによる定量法が報告されている。カラムにC18を用い、移動相に0.1%トリフロロ酢酸含有のアセトニトリル-メタノール-テトラヒドロフラン-水(67:10:10:13)を使用し、SIMのモニターイオンにはそれぞれのプロトン化分子が利用されている。試料溶液の調製にはヘキサン抽出が用いられ、回収率は5 ppb添加で84%以上、変動係数は10%以下であった。

3.1.2 合成抗菌剤

キノロン剤やサルファ剤に代表される合成抗菌剤も上述の抗生物質と同様に畜水産動物の疾病の治療に使用され、残留分析法の確立が必要とされている。したがって、これらの分析にもLC/MSが使用されている。

牛乳及びサケの組織中に残留する15種類のキノロン剤のショートカラムを用いたESI LC/MS/MSによる分析法が報告されている²⁸⁾。内径4 mm長さ50 mmのカラムを用いることにより、7分以内に15種類のキノロン剤を分離し、検出感度も向上し、牛乳及びサケの組織中の濃度として1 ppbという高感度を実現している。移動相はアセトニトリル-0.02 mol/Lギ酸(2:98)を流速1.0 mL/minで使用し、更に、キノロン剤のプロダクトイオンのイオン構造の詳細な検討を行っているので、キノロン剤のMSを測定するときに参考になる。

イオン化法としてAPCIを用いたLC/MS/MS(SRM)を、ナマズ筋肉中のキノロン剤の分析に応用した例もある²⁶⁾。ポリマー系カラムを用い、移動相を酢酸含有のアセトニトリル-テトラヒドロフランをグラジエント溶出で用いることにより、4種類のキノロン剤(オキシリン酸、ナリジクス酸、フルメキン、ピロミド酸)を20分間で分離している。SRMのモニターイオンとして $[M+H-H_2O]^+$ を用いたときの検出限界は、0.08~0.16 ppbであった。

豚腎臓中にMRLレベルで(100 ppb以下)残留する4種のサルファ剤(スルファメサジン、スルファメラジン、スルファジアジン、スルファキノキサリン)のESI LC/MS/MS(SRM)による分析法が報告されている³⁰⁾。カラムにC18を、移動相にメタノール-アセトニトリル-酢酸アンモニウムの混液を用いている。試料中のサルファ剤は酸性下で酢酸エチルで抽出された後、アミノカートリッジ及び強陽イオンカートリッジで精製される。検出限界は0.8 ppmであった。

3.1.3 ホルモン剤、寄生虫駆除剤

成長促進や肉質の改善のために使用されることがあるホ

ルモン剤についても、畜水産食品への残留が懸念され、我が国においてもMRLが設定されている。その設定値は大半はppbレベルと低く、高感度な分析法が要求され、LC/MSの報告例が多くある。

畜産動物の発育促進の目的で投与されるホルモン剤の中に蛋白同化剤があり、牛組織中の蛋白同化剤7種をAPCI LC/MSで分析した例がある³³⁾。カラムにC18を、移動相にメタノール-アセトニトリル-ギ酸アンモニウムの混液を使用し、SIMのモニタリングイオンにはそれぞれのプロトン化分子を選択している。試料からの蛋白同化剤の抽出精製には、超臨界抽出法が用いられ、平均回収率は67%、検出限界は10~100 ppbであった。これらの蛋白同化剤の分析には、従来、TMS化した後にGC/MSにより分析されていたが、LC/MSの使用により、煩雑なTMS化を行うことなく、分析が可能になった。

畜産動物の赤身肉の増大などの肉質改善に用いられる β -作動薬クレンブテロールのESI LC/MS/MS(SRM)による定量法の報告がある³²⁾。安定同位体(d_9 -クレンブテロール)を内標準物質に用い、筋肉、肝臓中のpptレベルの分析が可能である。試料からの過塩素酸抽出液はC18及び強陽イオンカートリッジで精製され、LC/MS/MSに供される。カラムにC18を、移動相に酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.3)-アセトニトリルを用いてグラジエント溶出を行う。SRMのモニターイオンには $[M+H-H_2O]^+$ が使用されている。回収率は63 $\pm$ 7%、検出限界は10 pptであった。

寄生虫による畜産動物の被害を最小限にとどめ、生産効率を向上させるために、寄生虫駆除剤は世界的に広く使用されている。したがって、LC/MSによる分析法も多く報告されている。食肉中に残留するニトロイミダゾール系寄生虫駆除剤3種(ロニダゾール、ジメトリダゾール、メトロニダゾール)のESI LC/MSによる分析法が報告されている³¹⁾。カラムにC18を、移動相にメタノール-アセトニトリル-ギ酸の混液を使用し、SIMのモニタリングイオンにはそれぞれのプロトン化分子及びアセトニトリル付加イオンを選択している。試料からの駆虫剤の抽出には、酢酸エチルが用いられ、回収率は73~97%、相対標準偏差は17~26%、定量限界は1~4 ppbであった。なお、内標準物質には d_3 -ロニダゾールが使用されている。

3.2 農薬

食品中の残留農薬の分析は、検出感度の点からGC-ECD, GC-NPD, GC-FPDあるいはGC/MSが汎用されてきたが、極性が高い農薬や熱に対して不安定な農薬の分析には、これらの手法は不適当である。そこで、最近ではLC/MSによる分析例が増えてきている。

リンゴ及び洋ナシ中に残留するカルベンダジム、チアベンダゾール、ジメトエート、フェノキシカーブ、ピリミカーブ、メチルチオファネート、ホスメットのESI LC/MS(SIM)が報告されている³⁵⁾。試料中の農薬はアセトン-ジクロロメタン-ヘキサン混液により抽出され、濃縮乾

固された後に、移動相に溶解され、LC/MS に注入される。カラムに C18 を、移動相にアセトニトリル-ギ酸アンモニウム溶液をグラジエント溶出で使用している。SIM のモニターイオンにはそれぞれのプロトン化分子を用い、同定にはタンデムマススペクトルを測定している。回収率は 55~98%, 相対標準偏差は 19% 以下、検出限界は 0.01~0.02 ppm となっている。内標準物質にはパーベンダゾールが用いられている。

APCI LC/MS (SIM) によるマッシュルーム中に残留する殺虫剤ジフルベンズロンの分析法が報告されている³⁶⁾。APCI プローブの温度が目的化合物の検出感度に影響することは良く知られているが、ジフルベンズロンの場合には温度が上昇するとともに感度も上昇するが、450℃ を境に感度が低下する。そこで著者らは APCI プローブの温度を 450℃ に設定している。また、本研究ではイオンを質量分析部に取り込む際の電圧（この機種の場合はコーン電圧という）とイオン強度の関係を調査している。すなわち、電圧が上昇するとともにフラグメントイオン m/z 156 の強度が強くなり、 m/z 309 の脱プロトン化分子の強度が弱くなる。著者らは SIM のモニターイオンに脱プロトン化分子を選択しているため、脱プロトン化分子の検出感度ができるだけ高くなるような低い電圧 (5~10 V) を選択している。試料からのジフルベンズロンの抽出にはジクロロメタン-シクロヘキサンが用いられ、サイズ排除クロマトグラフィーによる精製が行われている。マッシュルームからの回収率は 78~64% (0.06~0.58 ppm 添加時)、相対標準偏差は 16% 以下、検出限界は 0.017 ppm であった。

農作物全般に使用される殺虫剤であるアバメクチンの MRL は 0.01 ppm と低く設定されているので (EU)、HPLC による分析では十分な検出感度が得られない。そこで、柑橘類中に残留するアバメクチンの ESI LC/MS (SIM) による分析法が検討されている³⁴⁾。試料はマトリックス固相分散法 (C18, ジクロロメタン) により抽出・精製され、LC/MS 分析に供される。著者らはフラグメンター電圧 (イオンを質量分析部に取り込む際の電圧) などの MS 条件を検討して、最も検出感度の高い条件を設定している。SIM モニターイオンは、アバメクチンの主成分であるアベルメクチン B1a のナトリウム付加イオン (m/z 895) に設定されている。本法の回収率は 94~99% (0.01~10 ppm 添加時)、相対標準偏差は 5% 以下、定量限界は 0.0025 ppm であった。

3.3 天然毒素成分

かび毒あるいは貝毒に代表される天然毒素成分は、難揮発性で熱に不安定な化合物が多く、更に微量で有害な化合物も多いので、LC/MS による分析法が従来より検討されてきた。

トウモロコシを汚染する *Fusarium moniliforme* が産生するかび毒であるフモニシンは難揮発性で熱に不安定、更には構造中に発色団を有していないために、その分析は

もっぱらプレカラム誘導体化による UV あるいは蛍光検出 HPLC によって分析が行われてきた。そこで、煩雑な誘導体化を要しない ESI LC/MS によるコーンミール中のフモニシン B1, B2, B3 の分析法が報告されている⁴⁴⁾。カラムにポリマー系の充てん剤を用い、移動相にはアセトニトリルと酢酸アンモニウム緩衝液の混液を用い、SIM モニターイオンにはそれぞれのプロトン化分子 (B1: m/z 722, B2 及び B3: m/z 706) を用いている。フモニシンのマススペクトルはプロトン化分子がベースピークとして現れ、20% 弱の相対強度でナトリウム付加イオンが認められる以外は、構造に由来するようなフラグメントイオンは検出されていない。更にこの傾向はコーン電圧 (イオンを質量分析部に導入する際の電圧) を変化させても同様で、目立ったフラグメントイオンは観察されなかった。試料からのフモニシンの抽出はアセトニトリル-水混液で行い、その後、抽出液を水で希釈した後に C18 カートリッジにより精製を行っている。本法の検出限界は 20~100 ppb であった。

また、*Penicillium* 属の産生するかび毒であるパツリンの分析は、従来、誘導体化後、ガスクロマトグラフィーで分析されていたが、十分な検出感度が得られていなかった。Rychlik らは ¹³C でラベルしたパツリンを合成し、これを内標準物質として使用した ESI LC/MS によるリングジュース及びパン中の分析法を検討した³⁹⁾。試料から酢酸エチルで抽出されたパツリンは、シリカゲルカートリッジにより精製され、LC/MS に供される。SIM モニターイオンは脱プロトン化分子 (パツリン: m/z 153, ¹³C-パツリン: m/z 155) が選択され、検出限界は 20 ppb、定量限界は 63 ppb であった。HPLC-UV 法のこれらの値はそれぞれ 1.3 ppb 及び 4 ppb であるので、検出感度は劣るものの、LC/MS の同定能力は HPLC とは比べものにならないので、実試料を分析するためには有用な手法と思われる。

Quilliam によって ISP LC/MS による貝類中の 4 種類の下痢性貝毒 (オカダ酸, ジノフィシストキシン-1, -2, -3) の分析法が報告されている⁴³⁾。カラムに C18 を、移動相にはトリフロロ酢酸含有メタノール水を、SIM モニターイオンにはそれぞれのプロトン化分子を用い、内標準物質にはアセチルオカダ酸を使用している。オカダ酸、ジノフィシストキシン類のマススペクトルはプロトン化分子がベースピークとして現れるが、オリフィス電圧 (イオンを質量分析部に導入する際の電圧) を高く設定すると、脱水イオンの強度が強くなり、最終的にはプロトン化分子は検出されなくなる。試料からの抽出は含水メタノールで行い、その後、クロロホルムで脱脂した後にアミノプロピルシリル化シリカゲルクロマトグラフィーにより精製を行っている。0.05~5 ppm 添加時の回収率は 75~80% であった。

3.4 その他

現在使用されている天然着色料のほとんどは、複数の色

素成分の混合物であり、その成分の組成は原料採取場所、時期、抽出方法の差異により一定とはならない。したがって、これらの天然着色料を同定・定量するために、LC/MS は非常に有効な分析手法である。

ラックカイガラムシの分泌物より抽出して得られ、天然着色料として広く食品に使用されているラック色素は、ラッカイン酸 A, B, C, E を主色素成分とするが (図 12)、上述のように、色素成分の比率は一定とはならないことから、確実な同定法が必要とされている。

図 12 現在までに報告されている LC 条件は、ピークのテーリングを防ぐとともに、上述の主成分を分離するために、前述の TCs の場合と同様に不揮発性のシュウ酸が移動相に添加されており、直接 LC/MS には適用できず、実用化されていなかった。そこで、これを防ぐために揮発性のアセチルアセトンを含んだ移動相を用いて ESI LC/MS/MS を行い、ゼリー中のラック色素の同定が試みられている⁵¹⁾。カラムに C18 を、移動相に 0.005 mol/L アセチルアセトンを含むアセトニトリル-TFA 混液により、テーリングのないクロマトグラムが得られ、良好なマススペクトルが得られている。プレカーサーイオンに脱プロトン化分子を選択して得られたタンデムマススペクトル

ラッカイン酸 A	R=CH ₂ CH ₂ NHCOCH ₃	M.W. 537
ラッカイン酸 B	R=CH ₂ CH ₂ OH	M.W. 496
ラッカイン酸 C	R=CH ₂ CH(COOH) NH ₂	M.W. 539
ラッカイン酸 E	R=CH ₂ CH ₂ NH ₂	M.W. 495

図 12. ラッカイン酸

には、 $[M-H-H_2O]^-$, $[M-H-CO_2]^-$, $[M-H-CO_2-H_2O]^-$, $[M-H-2CO_2]^-$ 及び $[M-H-2CO_2-H_2O]^-$ が明確に出現し、同定に有効なスペクトルが得られた。もちろん、アセチルアセトンを添加したことによると思われるイオン化の抑制や妨害イオンは認められなかった。そこで、ゼリーから色素をシュウ酸含有メタノールで抽出し、C18 カートリッジにより精製したラック色素を本手法により分析したところ、良好にラック色素を同定することができた (図 13)。

内分泌かく乱化学作用が疑われる物質の 1 つとしてリストアップされ、ポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料として使用されているビスフェノール A の ESI LC/MS による缶飲料中の定量法が報告されている⁵²⁾。カラムに C18 を、移動相にアセトニトリル-酢酸水溶液を用い、SIM モニターイオンには脱プロトン化分子である m/z 227 が選択されている。ビスフェノール A はその構造中にフェノール基を有することから、イオン化モードにはネガティブが採用されている。試料の精製には C18、強陽イオン交換、強陰イオン交換樹脂が混合して充てんされているカートリッジが用いられ、コーヒー、紅茶などに飲料からの回収率 (5 ppb 添加時) は、85% 以上、検出限界は 0.5 ppb である。

4. おわりに

冒頭で述べたように、質量分析法は同定能力に優れていることから、様々な分離手法との結合が図られてきた。その成功例の代表が GC/MS である。現在この GC/MS は、非常に安定した高い性能を発揮する分析装置として、農産物中の残留農薬や飲料水中のトリハロメタンなどの分析に広く用いられており、かなり高価な機器にもかかわらず、汎用の分析機器と呼べるまでの地位を確保するに至っている。この GC/MS に 10 年以上遅れて実用化された LC/MS だが、現在その適用範囲は急速に拡大しており、その実力を十分に発揮し、GC/MS と肩を並べる日はそれほど

図 13. 市販ゼリー中に検出されたラッカイン酸のタンデムマススペクトル

遠くないと思われる。その日のために、GC/MS で採用されているようなチューニングの自動化あるいは分析パラメーターの簡略化といった装置面での改良が必要であろうし、更に、応用面では、イオン化効率を損ねない移動相あるいはイオンペア試薬の開発なども必要であろう。これらの点をメーカーとユーザーが知恵を出し合いながら工夫し、様々な化合物の分析に適用して、応用例を増やす努力が必要である。

文 献

- 1) Hiraoka, K., Introduction of the LC/MS interfaces: their fundamental aspects. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **41**, 101-120 (1993).
- 2) Niessen, W. M. A., Tinke, A. P., Liquid chromatography-mass spectrometry general principles and instrumentation. *J. Chromatogr. A*, **703**, 37-57 (1995).
- 3) Yamaguchi, K., Sakamoto, S., Electrospray ionization mass spectrometry. *Bunseki*, 315-321 (1999).
- 4) Niwa, T. ed., "Saishin No Masusupekutorometori (Modern mass spectrometry)", Kyoto, Kagaku Dojin, 1995. (ISBN 4-7598-0282-7)
- 5) Harada, K., Oka, H. eds., "LC/MS No Jissai", Tokyo, Kodansha Scientific, 1997. (ISBN 06-153373-8)
- 6) Ueno, T., Hirayama, K., Harada, K., "Biological mass spectrometry", Tokyo, Tokyo Kagaku Dojin, 1997. (ISBN 4-8079-1331-X)
- 7) Yamashita, M., Fenn, J. B., Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *American Chemical Society*, **88**, 4,451-4,459 (1984).
- 8) Horning, E. C., Horning, M. G., Carroll, D. I., Dzidic, I., Stillwell, R. N., New picogram detection system based on as mass spectrometer with external ionization source at atmospheric pressure. *Anal. Chem.*, **45**, 936-943 (1973).
- 9) Oka, H., Matsumoto, H., Uno, K., Harada, K., Kadowaki, S., Suzuki, M., Improvement of chemical analysis of antibiotics. VIII. Application of prepacked C18 cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver. *J. Chromatogr.* **325**, 265-274 (1985).
- 10) Nakazawa, H., Ino, S., Kato, K., Watanabe, T., Ito, Y., Oka, H., Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **732**, 55-64 (1999).
- 11) Oka, H., Ikai, Y., Ito, Y., Hayakawa, J., Harada, K., Suzuki, M., Odani, H., Maeda, K., Improvement of chemical analysis of antibiotics. XXIII. Identification of residual tetracyclines in bovine tissues by electrospray high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **693**, 337-344 (1997).
- 12) Oka, H., Ikai, Y., Hayakawa, J., Harada, K., Asukabe, H., Suzuki, M., Himei, R., Horie, M., Nakazawa, H., MacNeil, J. D., Improvement of chemical analysis of antibiotics. 22. Identification of residual tetracyclines in honey by frit FAB LC-MS using a volatile mobile phase. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2,215-2,219 (1994).
- 13) Ito, Y., Ikai, Y., Oka, H., Matsumoto, Y., Miyazaki, T., Takeba, K., Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis. (IV). Confirmatory assay of benzylpenicillin, phenoxymethyl-penicillin, oxacillin, cloxacillin, nafcillin and dicloxacillin in bovine tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **911**, 217-223 (2001).
- 14) Hormazabal, V., Yndestad, M., Determination of benzylpenicillin and other beta-lactam antibiotics in plasma and tissues using liquid chromatography-mass spectrometry for residual and pharmacokinetic studies. *J. Liq. Chromatogr.*, **21**, 3,099-3,110 (1998).
- 15) Heller, D. N., Ngoh, M. A., Electrospray ionization and tandem ion trap mass spectrometry for the confirmation of seven beta-lactam antibiotics in bovine milk. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 2,031-2,040 (1998).
- 16) Blanchflower, W. J., Hewitt, S. A., Kennedy, D. G., Confirmatory assay for the simultaneous detection of five penicillins in muscle, kidney and milk using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analyst*, **119**, 2,595-2,601 (1994).
- 17) Straub, R., Linder, M., Voyksner, D., Determination of beta-lactam residues in milk using perfusive-particle liquid chromatography combined with ultrasonic nebulization electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **66**, 3,651-3,658 (1994).
- 18) Tyczkowska, K. L., Voyksner, R. D., Straub, R. F., Aronson, A. L., Simultaneous multiresidue analysis of beta-lactam antibiotics in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet detection and confirmation by electrospray mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, **77**, 1,122-1,131 (1994).
- 19) Horie, M., Ishii, R., Yoshida, T., Hoshino, Y., Nakazawa, H., Determination of erythromycin and oleandomycin in meat and fish by LC-MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **40**, 309-313 (1999).
- 20) Carson, M. C., Heller, D. N., Confirmation of spectinomycin in milk using ion-pair solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **718**, 95-102 (1998).
- 21) Keever, J., Voyksner, R. D., Tyczkowska, K. L., Quantitative determination of ceftiofur in milk by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **794**, 57-62 (1998).
- 22) Ballard, J. M., Payne, L. D., Egan, R. S., Wehner, T. A., Rahn, G. S., Tom, S., Development and validation of an HPLC-MS-MS method for the confirmation of eprinomectin marker residue in bovine liver tissue. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3,507-3,510 (1997).
- 23) Blanchflower, W. J., Kennedy, D. G., Determination of lasalocid in eggs using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analyst*, **120**, 1,129-1,132 (1995).
- 24) Schilling, J. B., Cepa, S. P., Menacherry, S. D., Bavda, L. T., Heard, B. M., Stockwell, B. L., Liquid chromatogra-

- phy combined with tandem mass spectrometry for the confirmation of sarafloxacin in catfish tissue. *Anal. Chem.*, **68**, 1,905–1,909 (1996).
- 25) Blanchflower, W. J., Kennedy, D. G., Determination of monensin, salinomycin and narasin in muscle, liver and eggs from domestic fowl using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **675**, 225–233 (1996).
- 26) Doerge, D. R., Bajic, S., Multiresidue determination of quinolone antibiotics using liquid chromatography coupled to atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 1,012–1,016 (1995).
- 27) McLaughlin, L. G., Henion, J. D., Kijak, P. J., Multiresidue confirmation of aminoglycoside antibiotics in bovine kidney by ionspray high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 417–429 (1994).
- 28) Volmer, D. A., Mansoori, B., Locke, S. J., Study of 4-quinolone antibiotics in biological samples by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **69**, 4,143–4,155 (1997).
- 29) McCracken, R. J., Kennedy, D. G., Determination of the furazolidone metabolite, 3-amino-oxazolidin-2-one, in porcine tissues using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland. *J. Chromatogr. B*, **691**, 87–94 (1997).
- 30) Porter, S., Confirmation of sulfonamide residues in kidney tissue by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst*, **119**, 2,753–2,756 (1994).
- 31) Hurtaud-Pessel, D., Delepine, B., Laurentie, M., Determination of four nitroimidazole residues in poultry meat by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **882**, 89–98 (2000).
- 32) Guy, P. A., Savoy, M. C., Stadler, R. H., Quantitative analysis of clenbuterol in meat products using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **736**, 209–219 (1999).
- 33) Huopalahti, R. P., Henion, J. D., Application of supercritical-fluid extraction and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of some anabolic agents directly from bovine tissue samples. *J. Liq. Chromatogr.*, **19**, 69–87 (1996).
- 34) Valenzuela, A. I., Redondo, M. J., Pico, Y., Font, G., Determination of abamectin in citrus fruits by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **871**, 57–65 (2000).
- 35) Lacassie, E., Dreyfuss, M. F., Daguet, J. L., Vignaud, M., Marquet, P., Lachatre, G., Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry multi-residue determination of pesticides in apples and pears. *J. Chromatogr. A*, **830**, 135–143 (1999).
- 36) Barnes, K. A., Startin, J. R., Thorpe, S. A., Reynolds, S. L., Fussell, R. J., Determination of the pesticide diflufenzuron in mushrooms by high-performance liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **712**, 85–93 (1995).
- 37) Newsome, W. H., Lau, B. P. Y., Ducharme, D., Lewis, D., Comparison of liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry and liquid chromatography-postcolumn fluorimetry for determination of carbamates in food. *J. AOAC Int.*, **78**, 1,312–1,316 (1995).
- 38) Hormazabal, V., Ostensvik, O., Underdal, B., Skulberg, L. M., Simultaneous determination of the cyanotoxins anatoxin A, microcystin desmethyl-3, LR, RR, and YR in fish muscle using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Liq. Chromatogr.*, **23**, 185–196 (2000).
- 39) Rychlik, M., Schieberle, P., Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3,749–3,755 (1999).
- 40) Lewis, R. J., Jones, A., Vernoux, J. P., HPLC-tandem electrospray mass spectrometry for the determination of sub-ppb levels of Pacific and Caribbean ciguatoxins in crude extracts of fish. *Anal. Chem.*, **71**, 247–250 (1999).
- 41) Vahl, M., Jorgensen, K., Determination of aflatoxins in food using LC/MS/MS. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, **206**, 243–245 (1998).
- 42) Suzuki, T., Mitsuya, T., Matsubara, H., Yamasaki, M., Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from sea water and from the dinoflagellate *Dinophysisfortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultra-violet detection. Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops. *J. Chromatogr. A*, **815**, 155–160 (1998).
- 43) Quilliam, M. A., Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorimetric and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.*, **78**, 555–570 (1995).
- 44) Doerge, D. R., Howard, P. C., Bajic, S., Preece, S., Determination of fumonisins using online liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 603–606 (1994).
- 45) Lukacs, Z., Schaper, S., Herderich, M., Schreier, P., Humpf, H. U., Identification and determination of fumonisin FB1 and FB2 in corn and corn products by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, **43**, 124–128 (1996).
- 46) Lacker, T., Strohschein, S., Albert, K., Separation and identification of various carotenoids by C30 reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to UV and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, **854**, 37–44 (1999).
- 47) van Breemen, R. B., Electrospray liquid chromatography-mass spectrometry of carotenoids. *Anal. Chem.*, **67**, 2,004–2,009 (1995).
- 48) Ichi, T., Higashimura, Y., Katayama, T., Koda, T., Tada, M., Determination of a food colorant, gardenia yellow pigment, in processed foods with a high-performance liquid chromatograph/photodiode-array detector/mass

- spectrometer system. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **36**, 482-489 (1995).
- 49) Giusti, M. M., Rodrigues, Saona, L. E., Griffin, D., Wrolstad, R. E., Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4,657-4,664 (1999).
- 50) Lazarus, S. A., Adamson, G. E., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H., High-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3,693-3,701 (1999).
- 51) Oka, H., Ito, Y., Yamada, S., Kagami, T., Hayakawa, J., Harada, K., Atsumi, E., Suzuki, M., Odani, H., Akahori, S., Maeda, K., Tanaka, T., Mizuo, M., Identification of lac dye components by electrospray high-performance liquid chromatography-mass tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **46**, 63-68 (1998).
- 52) Horie, M., Yoshida, T., Ishii, R., Kobayashi, S., Nakazawa, H., Determination of bisphenol A in canned drinks by LC/MS. *Bunseki Kagaku*, **48**, 579-587 (1999).
- 53) Pedersen, S. N., Lindholst, C., Quantification of the xenoestrogens 4-*tert*-octylphenol and bisphenol A in water and in fish tissue based on microwave assisted extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **864**, 17-24 (1999).
- 54) Barnes, K. A., Smith, R. A., Williams, K., Damant, A. P., Shepherd, M. J., A microbore high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for the determination of the phytoestrogens genistein and daidzein in comminuted baby foods and soya flour. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 130-138 (1998).
- 55) Barnes, S., Kirk, M., Coward, L., Isoflavones and their conjugates in soya foods; extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2,466-2,474 (1994).
- 56) Yamanaka, K., Horimoto, S., Matsuoka, M., Banno, K., Analysis of thiamine in dried yeast by high performance liquid chromatography and high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Chromatographia*, **39**, 91-96 (1994).
- 57) Hori, M., Sahashi, Y., Koike, S., Yamaoka, R., Sato, M., Molecular species analysis of polyunsaturated fish triacylglycerol by high-performance liquid chromatography-fast-atom-bombardment mass spectrometry. *Anal. Sci.*, **10**, 719-724 (1994).
- 58) Maillard, M. N., Giampaoli, P., Cuvelier, M. E., Atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) liquid chromatography-mass spectrometry: characterization of natural antioxidants. *Talanta*, **43**, 339-347 (1996).
- 59) Gioacchini, A. M., Roda, A., Galletti, G. C., Bocchini, P., Manetta, A. C., Baraldini, M., High performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of phenolic acids and aldehydes. *J. Chromatogr. A*, **730**, 31-37 (1996).
- 60) Volmer, D. A., Lay, J. O. Jr., Billedeau, S. M., Vollmer, D. L., Detection and confirmation of *N*-nitrosodialkylamines using liquid chromatography-electrospray ionization coupled online with a photolysis reactor. *Anal. Chem.*, **68**, 546-552 (1996).
- 61) Galceran, M. T., Moyano, E., Puignou, L., Pais, P., Determination of heterocyclic amines by pneumatically assisted electrospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **730**, 185-194 (1996).