

LC-MS/MSを用いた食品中に含まれるD-アミノ酸の分析

Optical isomer analysis for amino acids in foods by LC-MS/MS

鈴木 優理子
Yuriko Suzuki

大妻女子大学大学院 人間文化研究科 人間生活科学専攻 修士課程

キーワード : D-アミノ酸, LC-MS, 光学異性体分析
Key words : D-amino acid, LC-MS, Optical isomer analysis

1. 研究目的

アミノ酸は、一つの分子内にアミノ基 (NH₂) とカルボキシル基 (COOH) を有する化合物であり、タンパク質やペプチドを構成する成分である。タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸はグリシンを除いて、すべて L-体 (L-アミノ酸) で構成されている。一方、D-体 (D-アミノ酸) に関しては、長い間ごく一部の細菌が有するのみとされ、ほとんど関心が払われなかった。しかし、最近光学異性体を分離分析する技術の発達に伴い、微生物以外の高等生物にも微量であるが D-アミノ酸が存在することが明らかになった。また、D-アミノ酸の生体内での機能や合成に関与する酵素の存在も明らかとなり、現在では、神経伝達やホルモン調節との関連といった生理学的、医学的な観点から、精力的な研究がなされている。

一方、食品分野からのアプローチも始まっており、発酵食品中に含まれる D-アミノ酸含量や、D-アミノ酸量と味との関連について研究がなされている。また、D-アミノ酸の機能性に着目した食品開発の研究も推進されている。一般にアミノ酸の分析には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離した後、ニンヒドリンと反応させて生成するルーマンパープル (Ruhemann's purple) を検出する方法、オルトフタルアルデヒド (OPA) で蛍光誘導体化した後、HPLC で測定する方法等が用いられている。しかし、これらの分析法は、誘導体化操作が必要であり、操作が極めて煩雑である。

そこで、誘導体化操作の必要のない高速液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) による D-体、L-体アミノ酸の同時分析法の構築を目的とした。さらに、構築した方法を用いて市販発酵食品中に含まれる D-体、L-体アミノ酸含量を求め

ることを目的とした。

2. 研究実施内容

2.1 LC-MS/MS を用いた D-アミノ酸の分析法の開発

分離カラムに光学異性体の分離特性に優れたキラルカラム CHIROBIOTIC T を用い、測定には汎用性に優れたエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用いて検討した。アミノ酸は、構造中にアミノ基およびカルボキシル基を有していることから、ポジティブモードでもネガティブモードでも検出が可能と思われた。そこで、両モードを比較したところ多くのアミノ酸はポジティブモードに比べ、ネガティブモードでの検出感度は著しく劣っていたことから、検出にはポジティブモード (ESI+) を採用した。

コーン電圧を 10~40V の範囲で、コリジョンエネルギーを 10~40eV の範囲で変えて、プロトン化分子及びフラグメントイオンに及ぼす影響を調べた結果、表 1 に示した条件を設定した。示す。なお、本法における各アミノ酸の定量限界は、0.01 μ g/mL まで十分検出することが可能であった (S/N>10)。

アミノ酸の D-体と L-体の相互分離に関しては、一般に温度が低くなるに従い L 体と D 体はより良好に分離されることが報告されている。しかし、温度が低くなるに従い、カラム圧が大きくなることから、カラム温度は 25 $^{\circ}$ C を用いた。次に、移動相であるが、有機溶媒として汎用されている① MeCN、② MeOH 及び③ EtOH を比較した結果、分離能は EtOH>MeOH>MeCN の順であった。次に、添加剤として酢酸、ギ酸、酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウムを検討した結果、酢酸が検出感度、

相互分離能に優れていた。そこで、移動相には 0.05% 酢酸-0.05% 酢酸含有 EtOH を採用した。

表1 MS測定条件

Compound	ESI	Precursor	Product	Cone	Collision
		ion (m/z)	ion (m/z)		
Glycine	+	75.8	47.9	20	5
Alanine	+	89.9	43.9	20	10
Serine	+	105.9	59.8	20	10
Proline	+	115.9	69.8	20	10
Valine	+	118	71.8	20	10
Threonine	+	119.1	73.8	20	10
Cysteine	+	122	75.8	20	10
Leucine*	+	132	85.9	20	10
Isoleucine*	+	132	85.9	20	10
Asparagine	+	132.8	73.9	15	20
Aspartic acid	+	134	87.9	18	10
Glutamine	+	147	129.9	20	10
Lysine	+	147	129.9	20	10
Glutamic acid	+	147.9	83.9	20	20
Methionine	+	149.9	103.9	20	10
Histidine	+	156	109.9	20	10
Phenylalanine	+	166	119.9	20	10
Arginine	+	175	69.8	20	20
Tyrosine	+	182	164.9	20	10
Tryptophan	+	205	188	20	10

2.2 試験溶液調製法の検討

醤油、黒酢等の発酵食品は、メタノールで除タンパク後、遠心分離し、その上清を 10~5000 倍希釈して試験溶液とした。乳及びヨーグルトは、メタノールで振とう抽出後、遠心分離し、その上清を 2mL 分取し、水 3mL を加えた後に、Oasis HLB (150mg) カートリッジに負荷し、試験溶液を調製した (図 1)。

2.3 市販食品中のアミノ酸含量の測定.

都内で市販されている黒酢、米酢、醤油、乳及びヨーグルト中のアミノ酸含有量を測定した。遊離アミノ酸量は、醤油が最も多く、次いで黒酢、米酢、ヨーグルト、乳の順であった。多くの黒酢から D-アラニン、D-アスパラギン等が検出された。今後、さらに分析検体数を増やして行く予定である。

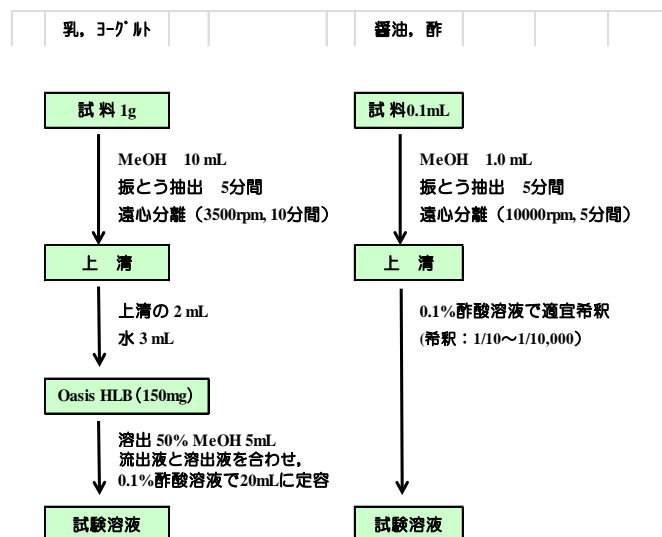


図1 前処理法の概略

3. まとめと今後の課題

D-アミノ酸の分析法として最も多用されている手法は、蛍光誘導体化及びキラル誘導体化後に ODS カラムを用いた HPLC で分離定量する方法である。しかし、本分析法は 2 回の誘導体化を必要とし、操作が煩雑である。そこで今回、分離カラムにキラルカラム CHIROBIOTIC T を使い、検出に質量分析計を採用した LC-MS/MS による D-及び L-アミノ酸の高感度且つ選択性に優れた分析法を構築した。本法を用いて市販されている黒酢や醤油等の発酵食品を分析した結果、検出されたアミノ酸のほとんどは L-体であったが、一部の黒酢からは比較的高濃度の D-アミノ酸が検出された。

4. この助成による発表論文等

①学会発表 (発表確定)

発表者名：鈴木優理子, 堀江正一

発表タイトル：LC-MS/MS を用いた食品中に含まれる D-アミノ酸の分析

学会等名：日本薬学会

発表年月日：2017 年 3 月 27 日

発表場所：宮城県仙台市 仙台国際センター