

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

近年, 黒酢, 醤油等の発酵食品中に D-アミノ酸が比較的高濃度で含まれていることが明らかとなり, D-アミノ酸生成機構や D-アミノ酸の新たな機能解明に大きな関心が寄せられている. 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. そこで本研究では, 分離カラムにキラルカラムを用い, 検出に質量分析計を採用した LC-MS/MS による D-及び L-アミノ酸分析法の試みた.

黒酢やヨーグルトの発酵食品では, 多量に含まれる食品由来成分を除去し, 分析目的成分である D-アミノ酸, L-アミノ酸を濃縮精製することが求められる. そこで, 一般に濃縮精製法として汎用されている固相抽出法を用いた前処理法の開発を検討した.

構築した分析法を用いて, 市販食品への応用として, アミノ酸飲料, 黒酢, 醤油, 乳及びヨーグルト等の発酵食品のアミノ酸量の測定を行う. また, ヨーグルト中に含まれる乳酸菌や乳酸菌の腸内での働き等の研究がいくつも報告されているが, ヨーグルト培養時間におけるアミノ酸量及び乳酸菌数の変化に関する研究はほとんどされていない. そこで, 乳にヨーグルトを加えてヨーグルトを作成し, 培養時間によるアミノ酸量, 乳酸菌数, pH, 酸度, 糖度等の変化について検討することを目的とした.

2. 研究実施内容

今回, 分離カラムにキラルカラム CHIROBIOTIC T を用い, 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.

表 1. LC-MS/MS 測定条件

LC conditions No.1	
Column	Chrobiotic T (2.0 x 250mm), 5µm
Flow-rate	0.2 mL/min
Column temp.	25°C
Injection size	5µL
Eluent	0.05% acetic acid-0.05% acetic acid-containing EtOH (58:42)

LC conditions No.2	
Column	Chrobiotic T (2.0 x 250mm), 5µm
Flow-rate	0.2 mL/min
Column temp.	25°C
Injection size	5µL
Eluent	Gradient A=0.05% acetic acid B=0.05% acetic acid-containing EtOH

Time (min)	A(%)	B(%)
0	20	80
20	80	20
30	80	20

MS conditions					
Compound	ESI	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)
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

本 LC-MS/MS 測定条件を用いることにより, ほとんどの遊離アミノ酸を, L-体と D-体に分離することが可能であった. 試験溶液の調製は, 食品中に含まれる幅広い化合物の精製法として汎用されている Oasis HLB カートリッジを用いた固相抽出

法を構築した。

本試験溶液調製法の妥当性評価するため、添加回収実験を行った。アミノ酸を 5ppm の濃度で添加し、添加回収実験を行った結果、ヨーグルト、牛乳いずれも回収率はおおむね 70%以上、標準偏差は 10%前後でありおおむね良好な結果が得られた。表 2 には L-体の添加回収率を示したが、D-体も同様の結果が得られた。

表 2. 添加回収実験

Compound	Yogurt		Milk	
	Added (μ g/g)	Recovery (%)	Added (μ g/g)	Recovery (%)
Glycine		101.4 \pm 21.3		97.9 \pm 5.3
L-Alanine		68.6 \pm 8.8		73.0 \pm 9.2
L-Serine		77.2 \pm 3.3		81.0 \pm 10.3
L-Proline		90.4 \pm 15.9		72.3 \pm 9.3
L-Valine		105.4 \pm 10.8		79.5 \pm 11.3
L-Threonine		104.6 \pm 12.7		81.1 \pm 12.4
L-Cysteine		101.4 \pm 21.3		101.4 \pm 21.3
L-Leucine*				
L-Isoleucine*		108.14 \pm 12.0		91.6 \pm 16.9
L-Asparagine	5	64.5 \pm 7.2	5	87.2 \pm 9.0
L-Aspartic acid		87.2 \pm 6.3		74.8 \pm 7.0
L-Glutamine		122.7 \pm 20.8		83.1 \pm 18.9
L-Lysine		78.9 \pm 8.4		73.4 \pm 8.2
L-Glutamic acid		84.0 \pm 8.9		98.0 \pm 8.1
L-Methionine		101.1 \pm 8.9		77.2 \pm 8.1
L-Histidine		90.4 \pm 12.3		78.9 \pm 11.3
L-Phenylalanine		101.6 \pm 9.8		77.6 \pm 5.9
L-Arginine		65.7 \pm 7.6		75.8 \pm 6.7
L-Tyrosine		98.4 \pm 6.7		80.3 \pm 7.8
L-Tryptophan		94.5 \pm 8.0		78.1 \pm 8.1

構築した試験溶液調製法を用いて市販されている黒酢や醤油、ヨーグルト等の発酵食品を分析した結果、検出されたアミノ酸の多くは L-体であったが、一部の黒酢からは比較的高濃度の D-アラニン等の D-アミノ酸が検出された。健康飲料として数多くの黒酢が市販されているが、今回 7 検体の黒酢製品を分析した結果、製品に表示されている遊離アミノ酸量と実際の分析値を比較した結果、分析値がかなり低い製品もみられた。醤油では、大豆原料（丸大豆・脱脂加工）の相違による遊離アミノ酸量、D-及び L-アミノ酸組成等に相違が見られるか検討した。原料に丸大豆を使用している醤油の方が遊離アミノ酸量が多く検出された。丸大豆を用いた醤油の方が熟成・発酵に時間がかかることから、アミノ酸が多く検出されたと考えた。また、醤油から検出されたアミノ酸は、全て L-アミノ酸であり、D-アミノ酸は、検出されなかった。

次に、牛乳にヨーグルト（乳酸菌）を加え、43°C で 24 時間発酵させ、発酵時間による遊離アミノ酸量及び乳酸菌数の変化を調べた。多くの遊離アミノ酸は、発酵開始時に比べ、発酵 1~3 時間で減少が見られたが、5 時間以降は、発酵時間と共にアミノ酸量は増加し、D-アラニン等の一部の D-アミ

ノ酸の生成が認められた。同様に、発酵開始時に比べ、発酵 1 時間で乳酸菌数は減少傾向が見られたが、3 時間以降は、発酵時間と共に乳酸菌数は、指数関数的に増加傾向が認められた。発酵開始時から、暫くは誘導期（発酵 1~3 時間）であり、アミノ酸量の減少が見られたが、発酵が進むにつれ、乳酸菌数及び遊離アミノ酸に増加が見られた。また、発酵により乳酸菌が増加することで、乳中のタンパク質が代謝され、アミノ酸量の増加につながったと考えられた。

ヨーグルト作成時の pH、糖度、酸度の変化では、牛乳にヨーグルトを添加することで、乳酸菌の生成するラクターゼ酵素が牛乳に含まれる乳糖（ラクトース）が代謝され、乳酸を生成する。発酵が進み、乳酸菌の増加により、乳酸量が増加し、牛乳の当初の pH である 6.5 付近から 4.5 付近まで下がることで、酸度が徐々に高くなると考えられた。

3. まとめと今後の課題

分離カラムにキラルカラム CHIROBIOTIC T を用いた、LC-MS/MS による高感度且つ選択性に優れた分析法を構築した。

黒酢や醤油はメタノールで除タンパクすることで、マトリックスの影響をほとんど受けることなく分析することができた。また、乳やヨーグルトはメタノールで除タンパク・抽出後、Oasis HLB カートリッジを用いることで、マトリックスの影響をほとんど受けることなく分析できた。

構築した分析法を用いることで、簡便で高感度にアミノ酸を分析することが可能であったことから、黒酢や醤油、ヨーグルト等の発酵食品の品質評価に応用することが期待できる。

なお、本分析法では、L-イソロイシンと L-ロイシン、D-及び L-アスパラギン酸を分離・定量することが困難であることから、更なる研究が必要だと考えられる。

4. この助成による発表論文等

②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 による発酵食品中の

D-及び L-アミノ酸の分析

学会等名：日本薬学会

発表年月日：2018 年 3 月 26 日

発表場所：石川県金沢市 金沢駅