

非ラベル化アミノ酸分析カラムを用いたLC/MSによる遊離アミノ酸分析の検討

バイオ系チーム 清野 珠美, 廣岡 青央

要 旨

本チームで従来行っていた、ガスクロマトグラフィーを用いたプレラベル化法による遊離アミノ酸分析は、アミノ酸のラベル化という前処理があるものの、1試料の分析時間が10分以内という迅速分析が可能であった。しかし、天然アミノ酸の1つで、清酒の苦味に寄与するアミノ酸であるアルギニンが検出できないという欠点があった。そこで今回、液体クロマトグラフィー-質量分析装置 (LC/MS) と非ラベル化アミノ酸分析カラムを用いて、多重反応検出 (Multiple reaction monitoring: MRM) モードによる、アルギニンを含んだ20種類の遊離アミノ酸分析の検討を行った。条件検討の結果、化学的な前処理を行わなくても、1試料15分で、20種類のアミノ酸を分離・検出することができ、ほとんどのアミノ酸が1-25 μ Mの濃度幅で良好な検量線を作成できた。またこの条件を用いた、実試料(麹汁培地, 清酒)のアミノ酸分析でも、再現性の高い結果が得られた。本法で得られる多成分データは、食品、特に清酒の品質管理に大きく貢献できると考えられる。

1. はじめに

食品におけるアミノ酸は、三大栄養素の1つであるタンパク質の構成成分であるとともに、ヒトが口にしたとき、個々に甘味、酸味、苦味を感じたり、他成分との相乗効果でうま味を感じるといった、味に寄与する成分でもある。ゆえに、食品に含まれるアミノ酸の量やその組成は、食品産業分野において重要な分析項目の1つとなっている。

アミノ酸分析には、現在ガスクロマトグラフィー (GC) や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が用いられている。本チームでは従来、アミノ酸分析キット EZ:faast (Phenomenex) によるプレラベル化法を用いた GC 分析¹⁾を採用してきた。しかし、この方法では、1試料10分以内で再現性の高い分析が可能であるが、天然アミノ酸の1つであるアルギニンが検出できないという欠点がある。アルギニンは、清酒の苦味に大きく寄与することが報告されており²⁾、清酒製造の技術貢献を目的としている本チームにとっては、アルギニンも分析可能な、アミノ酸迅速分析方法を確立する必要があった。一方で、HPLCを用いた方法では、ポストラベル化法によるイオン交換クロマトグラフィー³⁾やプレラベル化法による逆相クロマトグラフィー⁴⁾があるが、前者は検出させる複数のアミノ酸を、クロマトグラム上で完全に分離しなければならないため、分析時間の短縮が困難であること、後者は分析前にラベル化

操作が必要であり、試料マトリックスによってはラベル化効率が下がる可能性があること、といった難点があった。

近年普及している質量分析装置 (Mass spectrometer: MS) は、物質をイオン化し、その質量電荷比 (m/z) を選択的に検出・追跡することができる装置である。これをGCやHPLCの検出器として利用することで、クロマトグラフィーによるピークの分離が完全でなくとも、特定の m/z を追跡し、複数の成分を同時に、且つ高感度に検出することが可能となった。

さらに近年、インタクト株式会社から、液体クロマトグラフィー-質量分析装置 (LC/MS) 専用の非ラベル化アミノ酸分析カラムが開発された (図1左)。このカ

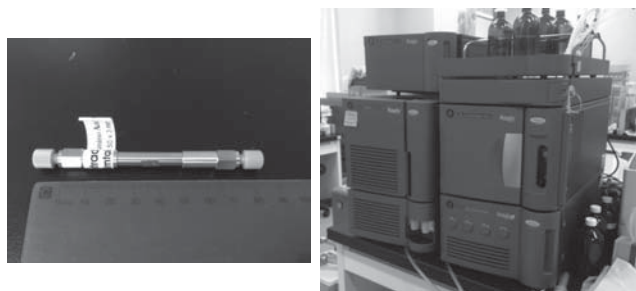


図1 左: 非ラベル化アミノ酸分析カラム (Intrada Amino Acid, Imtakt), 右: 液体クロマトグラフィー質量分析装置 (AQUITY TQD, Waters)

表 1 LC/MS分析条件

MS 条件	
イオン化	ESI, Positive, MRM モード
MRM トランジション	表 2 参照
LC 条件	
カラム	Intrada Amino Acid (50x3 mm, 3 μ m, Imtakt)
カラム温度	35°C
流速	0.5 mL/min
移動相 A	0.1%ギ酸-80%アセトニトリル
移動相 B	100 mmol/L ギ酸アンモニウム
溶出グラジエント	0-2 分 B 5
	2-8 分 B 5-100%
	8-11 分 B 100%
	11-15 分 B 5%
注入量	5 μ L

3. 結果と考察

3.1 標準アミノ酸の検量線とその直線性

各アミノ酸のm/zとそのプロダクトイオンのm/zの組み合わせ (MRM トランジション) の決定には、Masslynxソフトウェア(Waters)のIntelliStart機能を用いた。その際のMS検出はエレクトロスプレーイオン化 (ESI), Positiveモードで行った。得られた各アミノ酸のMRM トランジションを表2に示す。これを用いて、アミノ酸混合標準溶液を分析し、原点を通る検量線を作成した。図2はアミノ酸混合標準溶液10 μ mol/Lのマスクロマトグラムである。分析開始後9分までに、20種類のアミノ酸が検出されている。

検量線については、20種類すべてのアミノ酸において、500-1000 μ mol/Lの間で検量線が飽和する傾向が見られた。表2に示すように、一部を除き、ほとんどのアミノ酸は、1-25 μ mol/Lの濃度幅において直線性の寄与率 r^2 が0.99以上となった。プロリン、シスチン、ヒスチジンは、1-10 μ mol/Lにおいて r^2 が0.99以上となった。リジンは1-10 μ mol/L、アルギニンは1-25 μ mol/Lにおいて r^2 が0.98となった。よって、これらの濃度範囲で20種類のアミノ酸の良好な検量線が得られることが示された。

ラムは、ギ酸-アセトニトリル溶液とギ酸アンモニウム溶液という、2つの移動相を用いたグラジエント溶出によって、天然アミノ酸20種類を分離することができるカラムである。

本チームでは今年度、GCでは分析できなかったアルギニンを含む、天然アミノ酸20種類をより迅速に分析することを目的とし、上記の非ラベル化アミノ酸分析カラムと本研究所で所有しているLC/MS (図1右) を用いて、遊離アミノ酸分析条件を検討してきた。これまでに、LC/MSによる選択イオン検出 (Selected ion monitoring: SIM) モードを用いて、実際の試料による良好な分析結果が得られ、酒研会報にて報告している⁵⁾。SIMモードとは、特定のm/zを持つ物質を追跡し、選択的に検出するモードである。

本ノートでは、さらに検討を進め、LC/MSのもう1つの検出モードである多重反応検出 (Multiple reaction monitoring: MRM) モードによる分析条件を確立したので、その結果を報告する。MRMモードとは、SIMモードで選択した物質にエネルギーを当てて、物質を開裂させることで生成したプロダクトイオンのm/zを追跡するモードであり、SIMモードよりも選択性が高く、高感度な検出が可能である。

2. 実験方法

2.1 標準アミノ酸の分析

天然アミノ酸20種類のうち、トリプトファン、アスパラギン、グルタミンについては、蒸留水を用いて10 mmol/L混合溶液を作成した。それ以外のアミノ酸については、0.1 N HClを用いて10 mmol/L混合溶液を作成した。ただしシスチンのみ、濃度を5 mmol/Lにした。両液は-80°Cで保存した。使用時は両液を混合し、0.1%ギ酸を用いて希釈して1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 μ mol/Lのアミノ酸混合標準溶液を作成して分析に供した (この時シスチンは各濃度値の半分となる)。LC/MSの分析条件を表1に示す。

2.2 実試料を用いたLC/MSによる遊離アミノ酸分析

実試料として、麴汁培地および清酒サンプルを用いた。試料は0.1%ギ酸を用いて200倍に希釈し、0.45 μ m フィルターによるろ過後、分析に用いた。LC/MS分析条件は表1の通りである。試料濃度は、各アミノ酸のピーク面積と原点を通る標準溶液1, 5, 10 μ mol/Lの検量線を基に算出した。

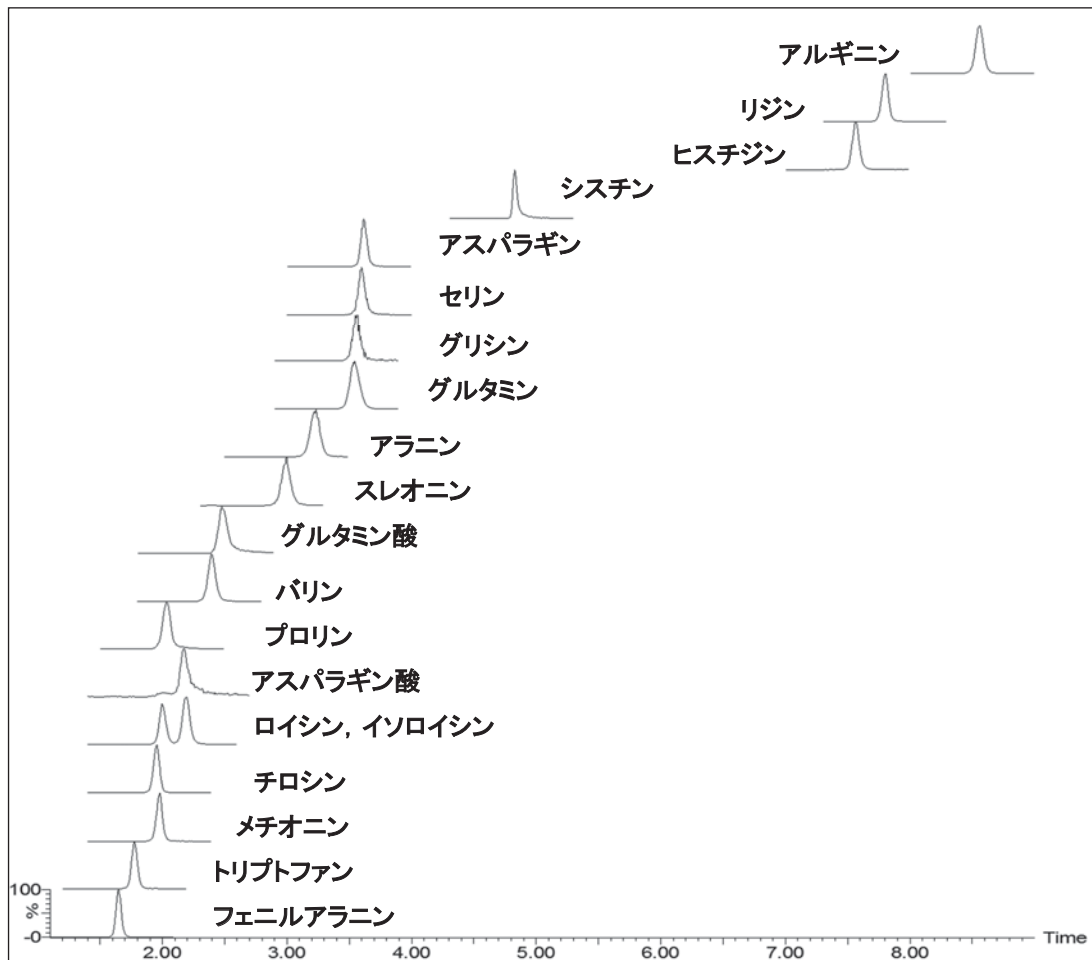


図2 アミノ酸混合標準溶液のマスククロマトグラム (Cystine : 5 μ mol/L, その他 : 10 μ mol/L)

3.2 実試料の遊離アミノ酸分析

表3に麴汁培地および清酒サンプルの各遊離アミノ酸濃度とCV値を示す。試料を200倍に希釈しても、麴汁培地のシスチンを除き、すべてのアミノ酸を検出し、濃度を算出することができた。また3回分析によるCV値も、一部10%を超えているが、ほとんどのアミノ酸で10%未満となり、おおむね再現性の高い結果が得られた。

表4では、同サンプルをSIM, MRMの両モードで分析した時の濃度値を比較した。MRMモードでのアミノ酸の濃度値は、ほとんどがSIMモードの場合から±数%の差で収まっていたが、麴汁培地のグルタミン、アスパラギン、リジン、アルギニンでは±10%超、清酒サンプルのアスパラギン酸およびアスパラギンでは±10%超、アルギニンでは±20%超の違いが見られた。

SIMモードよりもMRMモードで濃度値が低くなる

原因としては次のようなことが考えられる。化学的な前処理なしの試料にはアミノ酸以外にも様々な成分が含まれている。SIMモードのような一段階のm/z選択では、試料分析時に、アミノ酸と同じm/z値を持つ成分を同時に検出し、ピークを過大検出している可能性がある。一方、MRMモードで濃度値が大きくなる原因に関しては、現在のところ不明である。しかし、MRMはm/z値を二段階で選択するため、SIMよりも選択性は増している。ゆえに今回の結果も、原理的にMRMによる濃度値の方がより妥当な値であると考えられる。

麴汁培地のシスチンについては、SIMモードで1.75 ppmと検出されたが、実際のクロマトグラムを見ると、ノイズをピークとして検出していた。クロマトグラムにおけるベースラインのノイズの大きいSIMモードでは、希釈後試料の濃度が低かったため、そのノイズに目的ピークが埋もれてしまい、正しいピーク検出を行

表2 各アミノ酸のMRMトランジションと検量線の直線性

	MRM トランジション (m/z)	検量線	
		濃度幅 ($\mu\text{mol/L}$)	直線性の 寄与率 (r^2)
フェニルアラニン	165.91 > 119.93	1-25	0.9994
トリプトファン	204.98 > 145.91	1-25	0.9998
メチオニン	149.91 > 103.90	1-25	0.9918
チロシン	181.98 > 135.96	1-25	0.9942
ロイシン	131.98 > 85.93	1-25	0.9958
イソロイシン	131.98 > 85.93	1-25	0.9992
アスパラギン酸	133.88 > 87.89	1-25	0.9943
プロリン	115.94 > 69.91	1-10	0.9959
バリン	117.91 > 71.94	1-25	0.9996
グルタミン酸	147.94 > 83.92	1-25	0.9991
スレオニン	119.98 > 73.93	1-25	0.9994
アラニン	89.98 > 43.91	1-25	0.9998
グルタミン	146.94 > 83.92	1-25	0.9929
グリシン	75.81 > 29.91	1-25	0.9977
アスパラギン	132.88 > 73.90	1-25	0.9981
セリン	105.88 > 59.95	1-25	0.9991
シスチン	240.95 > 73.88	0.5-5	0.9921
ヒステジン	155.98 > 109.91	1-10	0.9936
リジン	146.98 > 83.94	1-10	0.9824
アルギニン	174.98 > 69.98	1-25	0.9819

表3 麴汁培地と清酒サンプルのアミノ酸分析結果

	麴汁培地		清酒サンプル	
	濃度* (ppm)	CV (%)	濃度* (ppm)	CV (%)
フェニルアラニン	621	2.3	232	2.5
トリプトファン	19.6	2.2	9.07	5.3
メチオニン	3.58	13	4.08	4.5
チロシン	92.6	1.6	55.7	2.4
ロイシン	146	0.35	84.8	0.57
イソロイシン	52.5	0.35	33.4	0.75
アスパラギン酸	82.5	0.69	43.2	1.1
プロリン	38.0	1.9	134	0.74
バリン	76.7	0.63	59.1	1.3
グルタミン酸	173	1.3	199	3.2
スレオニン	57.2	1.6	32.5	2.6
アラニン	88.5	2.9	209	0.54
グルタミン	17.9	0.85	99.3	2.0
グリシン	50.9	4.8	132	6.1
アスパラギン	21.5	11	53.4	11
セリン	89.7	3.9	58.4	4.4
シスチン	n. d.**	-	14.0	8.1
ヒステジン	24.2	3.1	30.9	3.6
リジン	52.5	0.43	44.0	0.67
アルギニン	118	2.3	74.5	18

*濃度は3回分析の平均値で示す。

**n. d.: Not detected. (ピーク未検出)

えなかったことが原因だと考えられる。同試料を、クロマトグラムのノイズが小さくなるMRMモードで分析したところ、200倍希釈した麴汁培地ではシスチンのピークは現れなかった。これらの結果から、この希釈倍率では麴汁培地中のシスチンは正しく検出されないことが示された。一方で、清酒サンプル中のシスチンはSIM, MRMモードともに検出された。食品中のアミノ酸濃度には大小があるため、各アミノ酸濃度がLC/MSの検出範囲に収まるように、試料の希釈倍率を考慮した方が、より正確な分析値を得られると考えられる。

4. まとめ

今回検討した分析条件により、試料の前処理なしに、1試料全15分で20種類のアミノ酸を分析することが可能となった。実際の食品試料を含め、分析値の再現性も比較的良好であった。特に清酒の苦味に寄与するアルギニンは、GCでは分析できなかったが、LC/MSを用いた今回の分析条件により分析可能である。そのため、本分析方法で得られる多成分データは、食品、特に清酒の品質管理に大きく貢献できると考えられる。今後、この分析条件を活用し、様々な試料のデータを蓄積していく予定である。

表4 SIRモードとMRMモードの比較

濃度* (ppm)	麴汁培地		清酒サンプル	
	SIM	MRM	SIM	MRM
フェニルアラニン	665	621	239	232
トリプトファン	18.2	19.6	9.38	9.07
メチオニン	3.55	3.58	3.80	4.08
チロシン	92.5	92.6	54.3	55.7
ロイシン	146	146	85.0	84.8
イソロイシン	51.6	52.5	33.0	33.4
アスパラギン酸	79.4	82.5	38.5	43.2
プロリン	37.7	38.0	134	134
バリン	74.9	76.7	58.3	59.1
グルタミン酸	169	173	198	199
スレオニン	55.1	57.2	31.5	32.5
アラニン	88.6	88.5	211	209
グルタミン	20.5	17.9	101	99.3
グリシン	53.6	50.9	134	132
アスパラギン	24.9	21.5	61.1	53.4
セリン	88.9	89.7	58.5	58.4
シスチン	1.75	n. d.**	14.9	14.0
ヒスチジン	24.0	24.2	30.8	30.9
リジン	46.2	52.5	42.1	44.0
アルギニン	136	118	97.5	74.5

*濃度は3回分析の平均値で示す。

**n. d.: Not detected. (ピーク未検出)

文献

- 1) 特開2000-310626.
- 2) 岩男君夫他:日本醸造協会誌, 99[9], 659(2004).
- 3) M. W. Dong, J. R. Gant: J. Chromatogr. A, 327, 17(1985).
- 4) R. L. Heinrikson, S. C. Meredith: Anal. Biochem, 136[1], 65(1984).
- 5) 清野珠美:酒研会報, 54, 39(2015).