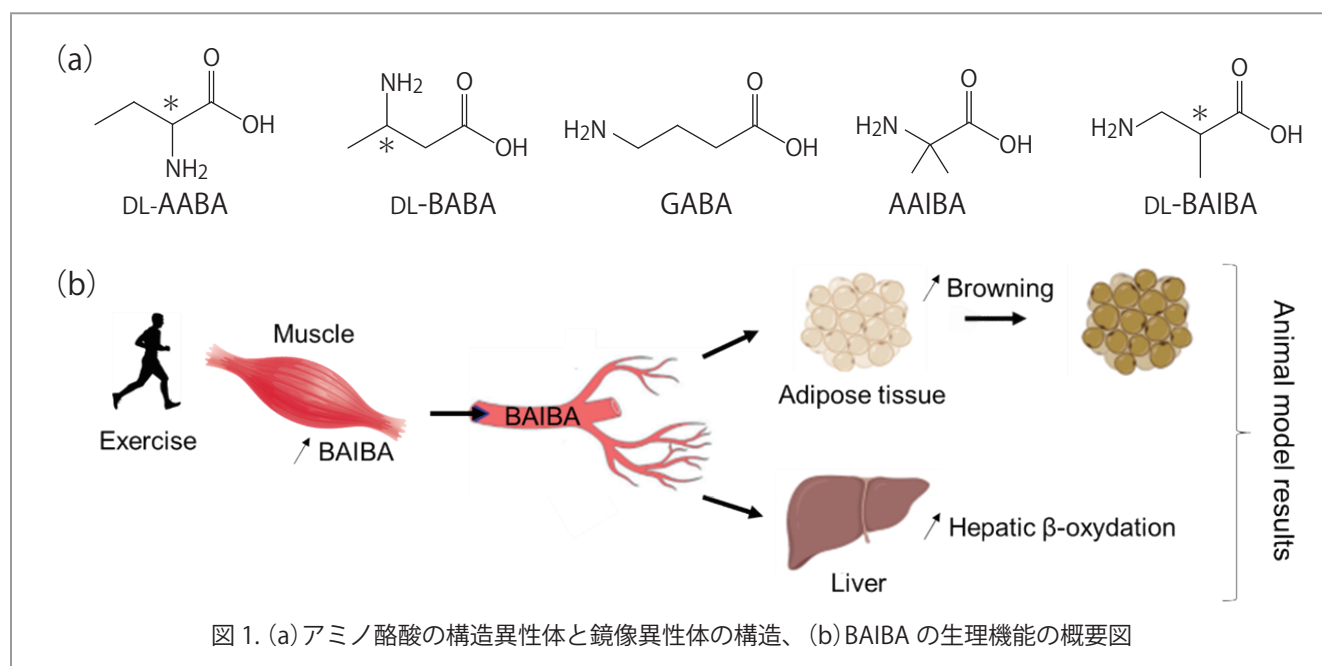


■ はじめに

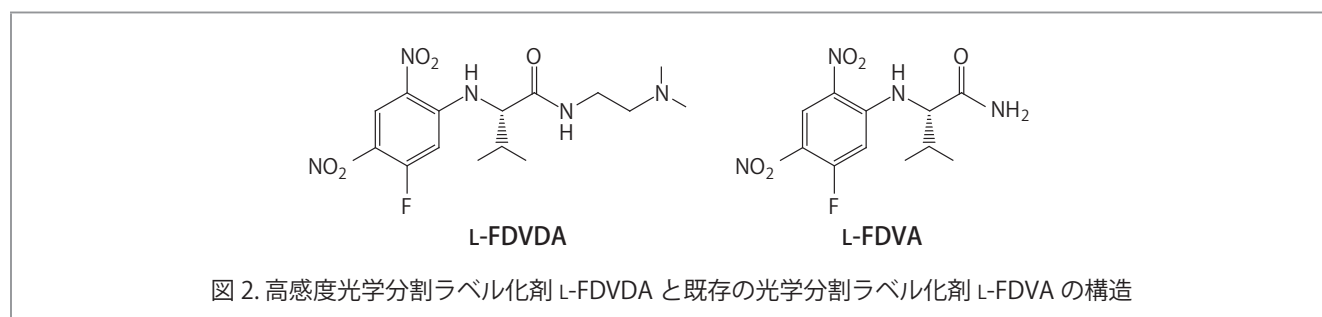
アミノ酪酸の全ての構造異性体と鏡像異性体を光学分割ラベル化剤 L-FDVDA で誘導体化(ラベル化)することによって、コスモシル 3C₁₈-EB カラムを用いて、液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)により分離・識別することができましたので、紹介します。本研究成果は、Analytical Methods, 2023;15:6648-55. の Front Cover に掲載されています。本研究は京都大学大学院 薬学研究科 創発医薬科学専攻 システムケモセラピー・制御分子学分野と共同で遂行されました。

■ アミノ酪酸の構造異性体と鏡像異性体

アミノ酪酸には図 1(a)に示すように、5つの構造異性体が存在し、その内3つは鏡像異性体を有しています。その中でも、3-アミノイソ酪酸(BAIBA)は、運動によって筋肉から分泌され、脂肪の燃焼、インスリン、トリグリセリド、コレステロールの調節など、細胞の代謝において重要な役割を担っており、近年ではさまざまな疾患に対する運動効果のバイオマーカーとして注目されています[図 1(b)]。これらの異性体はそれぞれに独自の生理機能を有していることから、各アミノ酪酸の生理メカニズムを詳細に解析するためには、それぞれの構造異性体と鏡像異性体を精密に分離・識別する必要があります。

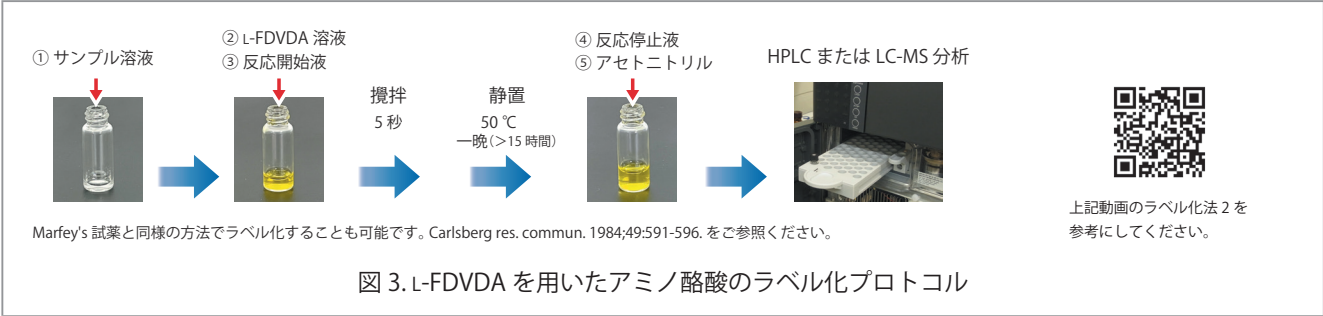


現在、アミノ酪酸の分離は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)や二次元 HPLC、LC-MS/MS を用いて、キラルカラムで分離されるか、もしくは光学分割ラベル化剤によりラベル化した後、汎用的な C₁₈ カラムで分離されています。しかしながら、8種類全てのアミノ酪酸の構造異性体と鏡像異性体の一斉分離ならびに、これらを高感度に検出することができる分析法は確立されていませんでした。そこで、弊社が販売している高感度タグを修飾した光学分割ラベル化剤 L-FDVDA(図 2 左)とコスモシル 3C₁₈-EB カラムを用いて、LC-MS により全アミノ酪酸を一斉に分離・識別することができる分析法の確立を試みました。また、アミノ酪酸の一斉分離の研究報告で使用されている L-FDVA(図 2 右)を用いて、各アミノ酪酸の分離挙動と MS 感度を本分析法と比較しました。



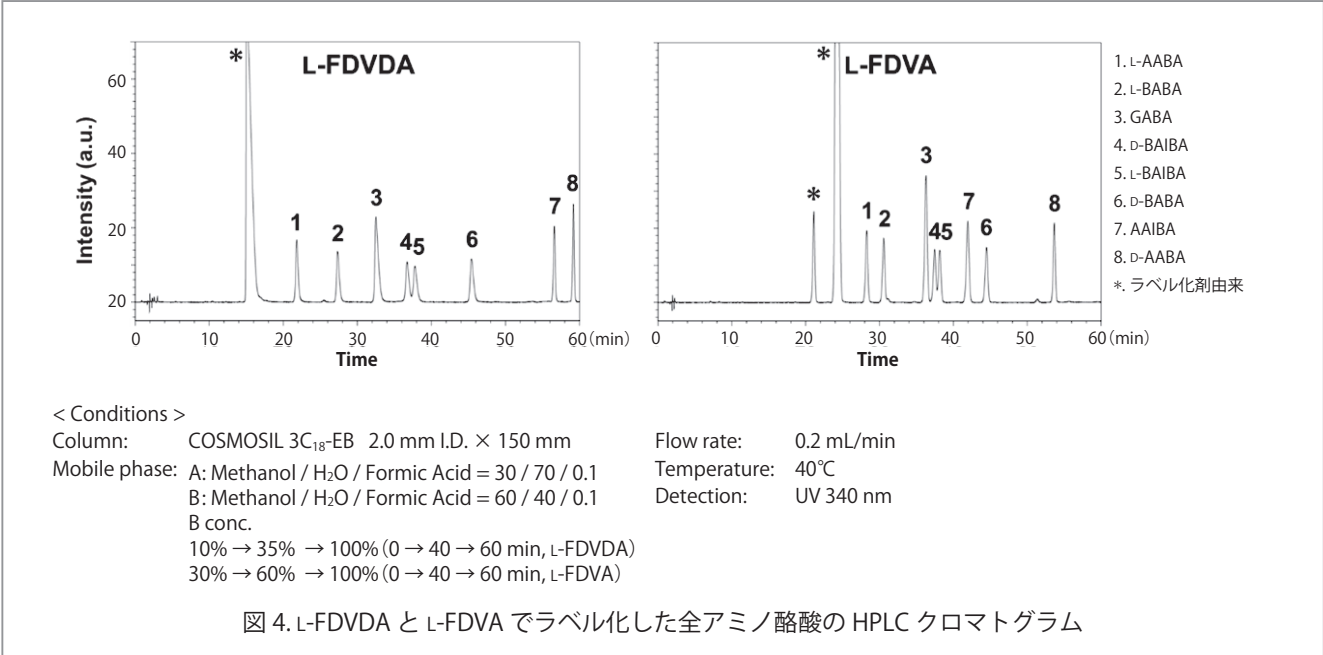
■ L-FDVDA を用いてラベル化した DL- アミノ酸の LC-MS 分析

DL- アミノ酸ラベル化キット (ラベル化剤 : D-FDLDA #19942-74) の各種反応溶液を使用し、L-FDVDA で全アミノ酪酸の構造異性体と鏡像異性体をラベル化した後、コスモシル 3C₁₈-EB カラムを用いて、HPLC と LC-MS で分析しました。



■ L-FDVDA と L-FDVA でラベル化したアミノ酪酸の分離の比較

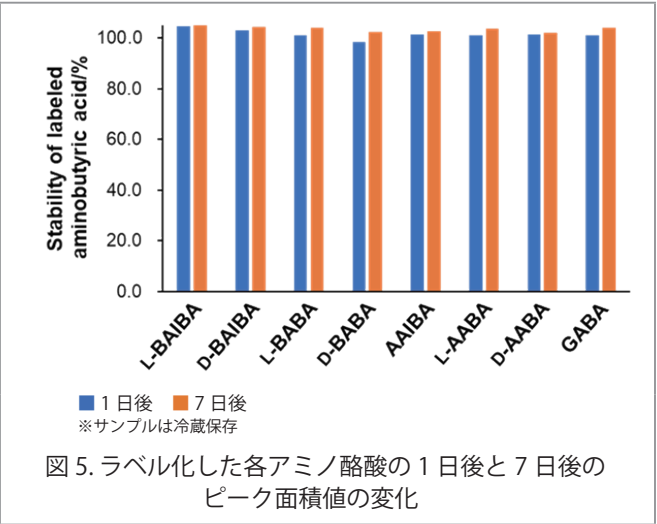
L-FDVDA と L-FDVA でラベル化したアミノ酪酸の全ての構造異性体と鏡像異性体を HPLC で分析し、分離挙動を比較しました。



L-FDVDA と L-FDVA のどちらでラベル化したサンプルにおいても 8 本のピークが確認されました。それぞれのラベル化剤におけるピークが近接したアミノ酪酸の分離度 (R_s) を算出したところ、GABA (ピーク 3) と D-BAIBA (ピーク 4) の R_s は 4.35 (L-FDVDA) と 1.54 (L-FDVA)、D/L-BAIBA (ピーク 4 と 5) の R_s は 1.06 (L-FDVDA) と 0.90 (L-FDVA) であり、L-FDVDA の方が分離に優れていることが示されました。

■ ラベル化した各アミノ酪酸の安定性評価

o- フタルアルデヒド (OPA) など一部のラベル化剤は安定性が低く、ラベル化したサンプルが経時的に劣化することがあります。複数のサンプルを測定する場合、標識サンプルは長期間安定である必要があります。そこで、L-FDVDA でラベル化した全てのアミノ酪酸の長期安定性を評価しました。全てのアミノ酪酸のピーク面積は、ラベル化反応終了後に分析し得られた値と 7 日経過後も変化していないことから、長期安定性も優れていることが示されました (図 5)。



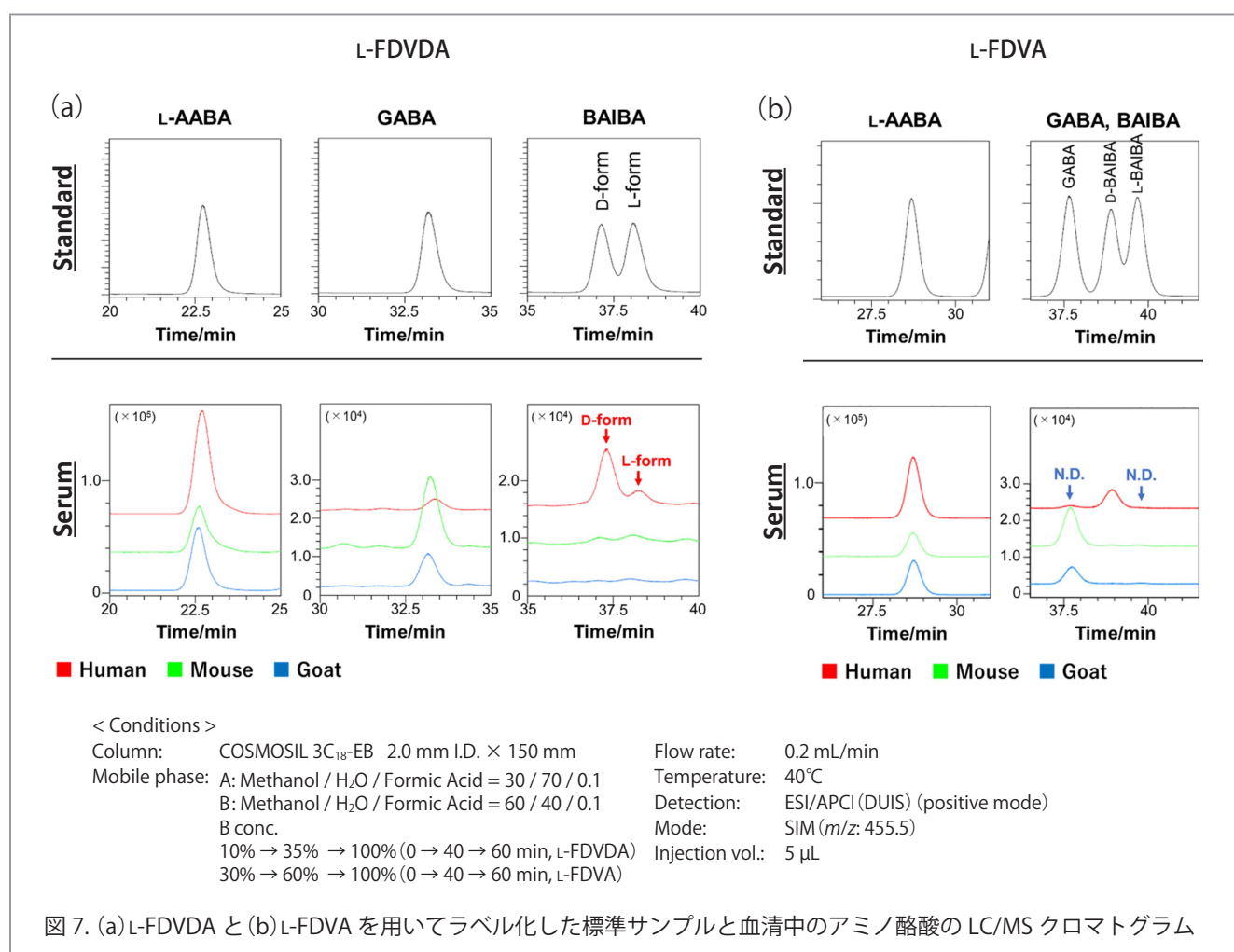
■ 血清の前処理方法

生体サンプルや食品中には多量のタンパク質や脂質などの成分が含まれています。タンパク質や脂質はカラムに吸着しやすいので、HPLC で分析するには、前処理によりこれらの物質を除去する必要があります。



■ 血清中のアミノ酪酸の分析における既存の光学分割ラベル化剤との MS 感度の比較

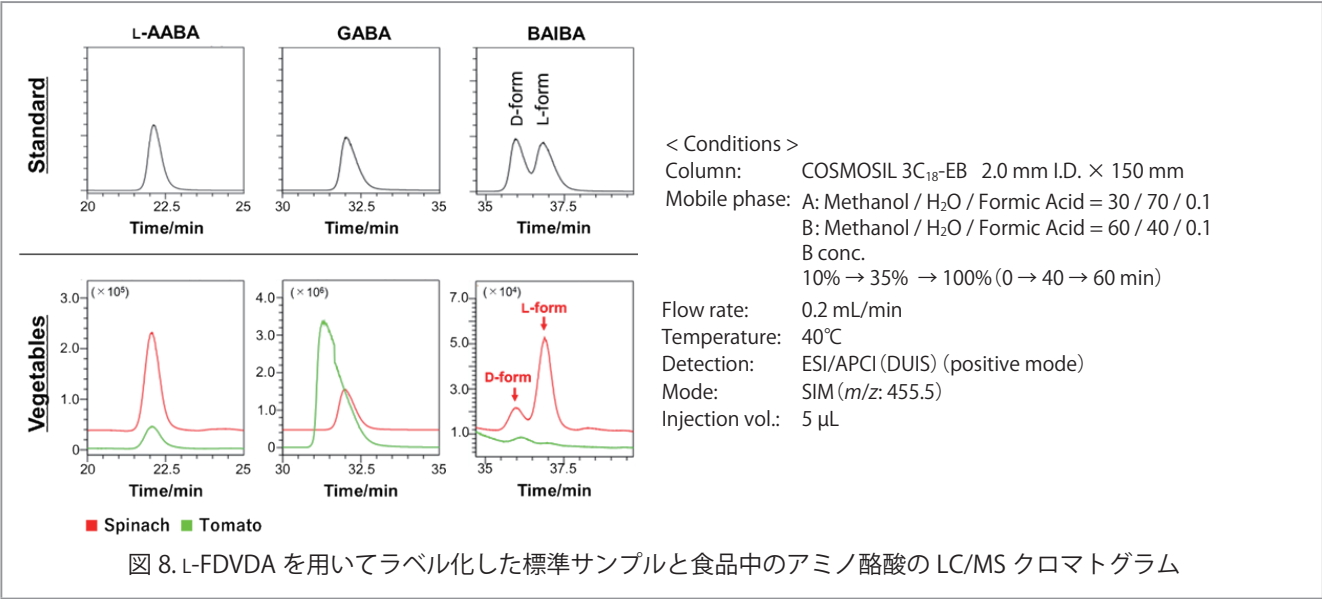
図 6 の通りにヒト、マウス、ヤギ血清を前処理した後、L-FDVDA でサンプルをラベル化し、動物種の違いによるアミノ酪酸の含有量の違いならびに既存のキラルラベル化剤 L-FDVA でラベル化したサンプルとの MS 感度を比較しました。



L-FDVDA でラベル化したサンプルでは、ヒト血清でのみ D 体 L 体両方の BAIBA が検出され、L 体よりも D 体の BAIBA の含有量が高いことが示されました。L-AABA と GABA は全ての動物種で検出されましたが、L-AABA の含有量はヒト>ヤギ>マウス、GABA の含有量はマウス>ヤギ>ヒトの順に高いことが示されました。以上の結果より、動物種ごとにアミノ酪酸の含有量が大きく異なっていることが示されました。一方、L-FDVA でラベル化したサンプルにおいては、L-FDVDA でラベル化したサンプルよりも全体的にピーク強度が小さくただでなく、L-FDVDA では検出されていたヒト血清の GABA および L-BAIBA のピークは検出されませんでした [図 7(b)]。このことから、L-FDVDA でラベル化することで、感度よく各アミノ酪酸を分離・識別できることが示されました。

■ 食品中のアミノ酸の分析

ホウレンソウとトマトをメタノールとクロロホルムを用いて前処理した後、L-FDVDAでラベル化し、LC-MSで分析しました。（前処理方法は論文をご参照ください。）



L-AABA の含有量はホウレンソウの方が高く、GABA の含有量はトマトの方が高いことが示されました。D/L-BAIBA はホウレンソウにのみ検出され、L 体の BAIBA の方が含有量は高いことが示されました。本分析法は、糖尿病や脂質異常症などの診断、代謝メカニズムや植物の免疫システムの解明など医療分野や生化学での研究に利用することが期待できます。

■ 参考文献

Ozaki M, Shimotsuma M, Kuranaga T, Kakeya H, Hirose T. Analytical Methods. 2023;15:6648-55.



※ Featured on Front Cover

■ 本研究で使用した製品

製品名	メーカー / 規格	製品番号	容量 / サイズ 内径 × 長さ (mm)	価格
1-フルオロ-2,4-ジニトロフェニル-5-L-バリン-N,N-ジメチルエチレンジアミンアミド (L-FDVDA)	SP (高速液体 クロマトグラフ用)	20363-24	50 mg	20,000
DL-アミノ酸ラベル化キット		19942-74	100 tests	30,000
コスモシル 3C ₁₈ -EB パックドカラム		09797-91	2.0 mm I.D. × 150 mm	58,000
ぎ酸		08965-82	25 mL	5,450
クロロホルム		08426-71	1 L	4,800
メタノール		21929-81	1 L	2,000
アセトニトリル		00430-41	1 L	8,000
TORAST Vial 8-425 スクリューバイアル	島津ジーエルシー	GLCTV-801	100 本 / 箱	2,700
TORAST Vial 8-425 セブタム	島津ジーエルシー	GLCTV-807	100 個	2,900

COSMOSIL はナカライテスク株式会社の登録商標です。QR コードは株式会社デンソーウェーブの登録商標です。
TORAST は株式会社島津ジーエルシーの登録商標です。

ご注意 試験・研究用以外には使用しないでください。

※掲載内容は予告なく変更になる場合があります。
※掲載価格は 2025 年 1 月現在のものです (消費税は含まれていません)。



ナカライテスク株式会社
〒604-0855 京都市中京区二条通烏丸西入東玉屋町498

● URL
<https://www.nacalai.co.jp/>
● 価格・納期のご照会
試薬はここに
0120-489-552
● 製品に関する技術的なご照会
<https://www.e-nacalai.jp/URL/?P=Contact>
TEL:075-211-2703

■ 販売取扱店