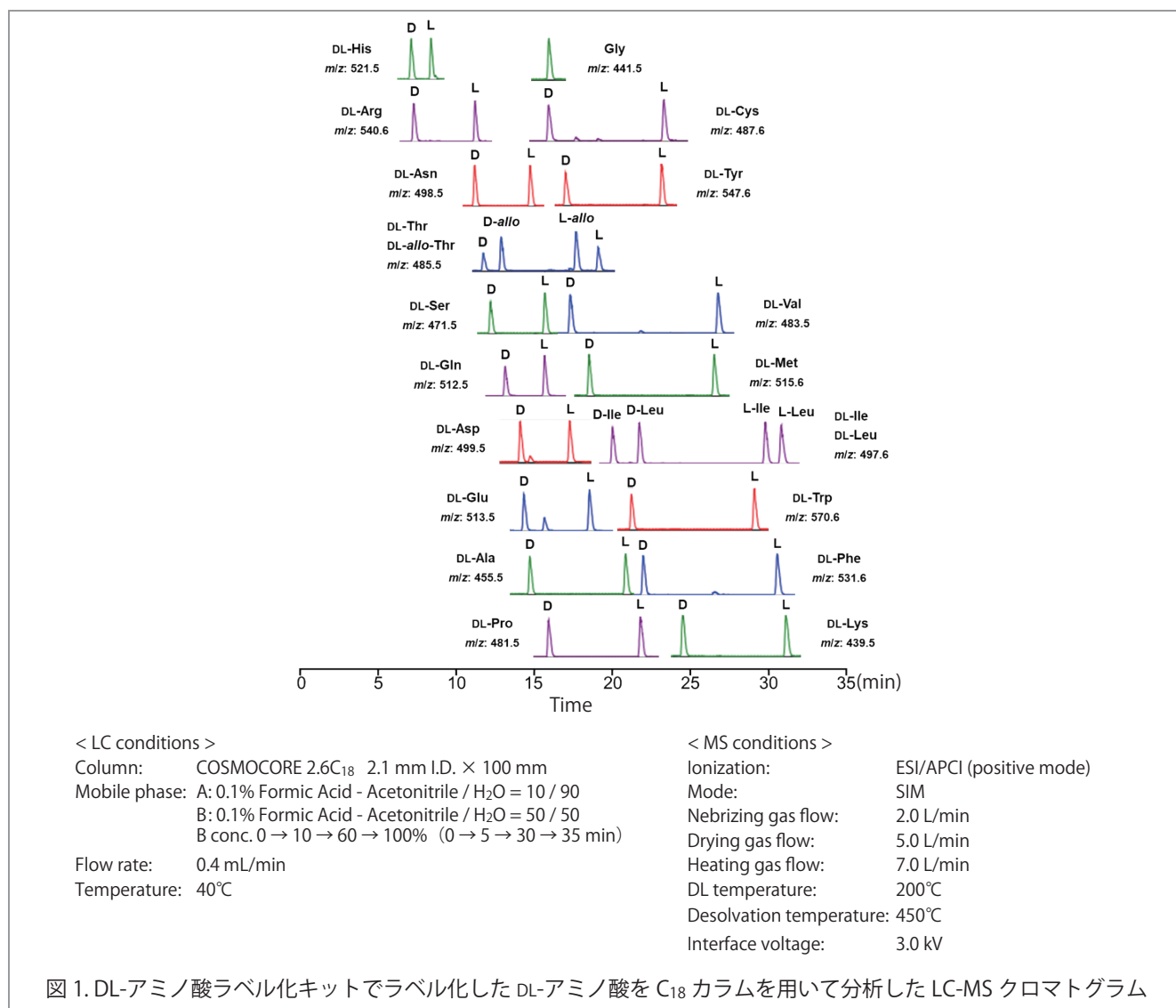


はじめに

発酵食品・飲料中の DL-アミノ酸を DL-アミノ酸ラベル化キット (ラベル化剤: D-FDLDA) でラベル化 (誘導体化) することで、コスモコア 2.6C₁₈ 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・定量することができましたので、紹介します。本研究成果は、Journal of Chromatography B. 2024;1244:124239. に掲載されています。本研究は大陽日酸株式会社と京都大学大学院 薬学研究科 創発医薬科学専攻 システムケモセラピー・制御分子学分野との共同研究成果です。

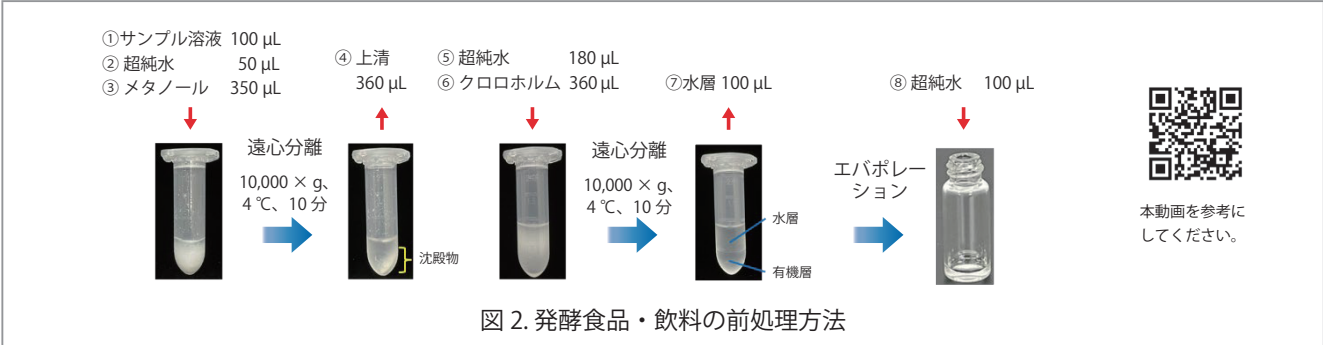
DL-アミノ酸分析の現状と実験の概要

生体内に存在するアミノ酸の大部分は L 体ですが、近年の分析技術の進展に伴い、D 体のアミノ酸も生体内に存在し、さまざまな機能を担うことが明らかにされてきました。食品においても、さまざまな味を示すアミノ酸が含まれており、その種類と含有量によって、食品の味は大きく変化します。D-アミノ酸は L-アミノ酸とは異なり、強い甘味を示すことから、食品添加物として使用されている例もあり、DL-アミノ酸の含有量を分析する技術の確立が求められています。一般的に、DL-アミノ酸の HPLC 分析には高価なキラルカラムが用いられますが、分離度が低いことに加えて、2 級アミンを有するプロリン (Pro) を分離できないといった問題もあります。弊社の DL-アミノ酸ラベル化キットを用いてラベル化することによって、DL-Pro やスレオニン (Thr) の立体異性体 (DL-Thr と DL-allo-Thr) を含めた 20 種類のアミノ酸を、汎用される C₁₈ カラムで分離することが可能です (図 1)。そこで、D-アミノ酸の含有量が多い発酵食品・飲料をメタノールとクロロホルムを用いた液-液抽出で前処理した後 (図 2)、DL-アミノ酸ラベル化キットを用いてラベル化し (図 3)、DL-アミノ酸の含有量を LC-MS 分析により分離・定量しました (表 1 ~ 3)。



■ 発酵食品・飲料の前処理

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ため、HPLC で分析する際には、前処理によりこれらの夾雑物を除去する必要があります。



■ 清酒中の DL-アミノ酸の含有量

表 2. DL-アミノ酸ラベル化キットでラベル化した清酒中の各 DL-アミノ酸の定量値

No.	#07		#08		#09		#10		#11	
Remarks	-		Kimoto		Kimoto		Yamahai		Yamahai	
Specific class	Ginjo		Junmai		Junmai Ginjo		Special Junmai		Junmai	
Amino acids (AA)	L-AA (μmol/L)	D-AA (μmol/L)	L-AA (μmol/L)	D-AA (μmol/L)	L-AA (μmol/L)	D-AA (μmol/L)	L-AA (μmol/L)	D-AA (μmol/L)	L-AA (μmol/L)	D-AA (μmol/L)
His	119.5	N.D.	250.6	1.5	175.4	tr	329.6	tr	388.7	tr
Arg	476.9	N.D.	565.4	10.3	56.1	N.D.	1031.3	N.D.	2119.3	12.9
Asn	317.6	3.3	581.8	10.3	415.1	4.5	777.3	5.1	756.2	7.8
Thr	113.6	N.D.	263.5	N.D.	184.6	N.D.	340.3	N.D.	414.5	N.D.
allo-Thr	tr	N.D.	tr	N.D.	tr	N.D.	6.7	N.D.	1.8	N.D.
Ser	246.1	tr	511.1	tr	363.0	tr	584.0	tr	733.3	tr
Gln	136.4	N.D.	tr	N.D.	33.6	N.D.	22.5	N.D.	tr	N.D.
Asp	181.2	tr	438.0	10.3	287.8	tr	430.5	5.9	518.5	4.1
Glu	555.3	tr	904.7	14.2	715.8	5.9	1128.2	6.7	1029.8	7.8
Ala	1147.8	tr	4227.8	72.8	1591.0	17.6	4641.8	6.0	3878.3	49.2
Pro	796.7	N.D.	2003.9	tr	1397.2	N.D.	1627.3	N.D.	1935.7	N.D.
Gly	454.9		1418.2		670.0		1618.2		1086.5	
Cys	84.0	-	193.6	-	280.0	-	240.8	-	241.3	-
Tyr	284.3	tr	921.6	tr	416.6	N.D.	659.7	N.D.	903.3	N.D.
Val	368.0	N.D.	1095.9	N.D.	369.3	N.D.	1107.8	N.D.	1076.8	N.D.
Met	19.4	22.5	24.2	37.0	28.3	33.0	61.8	44.7	91.2	41.3
Ile	155.8	N.D.	605.3	N.D.	180.6	tr	546.4	N.D.	609.9	N.D.
Trp	26.6	N.D.	N.D.	N.D.	26.8	N.D.	31.0	5.4	N.D.	tr
Leu	347.7	N.D.	1168.2	N.D.	407.9	N.D.	1050.2	tr	1201.1	tr
Phe	139.7	N.D.	549.9	N.D.	200.0	N.D.	377.1	N.D.	573.0	N.D.
Lys	206.0	N.D.	287.3	N.D.	218.4	N.D.	499.1	N.D.	710.6	N.D.
Total contents	5749.7	25.8	14592.9	156.3	7347.1	61.0	15493.2	73.9	17183.1	123.2

生酀・山廃造りの清酒(#08～#11)は普通酒(#07)と比較して、D-アミノ酸含有量が高いことが示されました。

■ 乳発酵飲料中の DL-アミノ酸の含有量

表 3. DL-アミノ酸ラベル化キットでラベル化した乳発酵飲料中の各 DL-アミノ酸の定量値

No.	#12		#13		#14		#15		#16		#17	
Nonfat milk solids	8.1%		8.4%		3.1%		3.2%		3.1%		0.1%	
Number of bacteria	Not clear		2.0 × 10 ⁹		2.0 × 10 ¹⁰		3.0 × 10 ¹⁰		1.1 × 10 ¹¹		Not clear	
Amino acids (AA)	L-AA (μmol/L)	D-AA (μmol/L)	L-AA (μmol/L)	D-AA (μmol/L)	L-AA (μmol/L)	D-AA (μmol/L)	L-AA (μmol/L)	D-AA (μmol/L)	L-AA (μmol/L)	D-AA (μmol/L)	L-AA (μmol/L)	D-AA (μmol/L)
His	113.8	N.D.	tr	N.D.	tr	N.D.	18.1	N.D.	21.0	N.D.	tr	N.D.
Arg	52.6	10.4	6.0	9.6	22.6	N.D.	57.0	N.D.	53.4	N.D.	7.7	10.2
Asn	29.4	tr	30.6	tr	7.9	2.8	8.3	3.8	24.0	3.3	N.D.	N.D.
Thr	70.7	N.D.	18.8	N.D.	73.9	N.D.	80.2	N.D.	64.5	N.D.	tr	N.D.
allo-Thr	tr	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	tr	N.D.	tr	N.D.	N.D.	N.D.
Ser	225.9	1.8	30.8	tr	tr	tr	48.9	tr	23.7	tr	tr	tr
Gln	254.8	tr	17.9	N.D.	tr	N.D.	N.D.	tr	tr	N.D.	N.D.	N.D.
Asp	118.1	74.8	11.5	3.3	75.8	42.7	157.3	71.4	134.9	58.2	12.8	tr
Glu	N.D.	57.4	4.7	45.5	238.9	75.6	475.3	87.3	570.7	72.3	14.3	tr
Ala	tr	tr	122.7	127.4	5.9	11.6	42.9	45.9	14.7	27.8	tr	tr
Pro	790.4	N.D.	119.1	N.D.	277.3	N.D.	440.9	N.D.	463.6	N.D.	tr	N.D.
Gly	tr		55.6		8.0		52.0		44.5		tr	
Cys	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Tyr	54.7	N.D.	37.9	N.D.	64.5	N.D.	108.0	N.D.	105.2	N.D.	tr	N.D.
Val	124.0	N.D.	19.6	N.D.	138.9	N.D.	218.1	N.D.	227.3	N.D.	tr	N.D.
Met	17.7	N.D.	13.7	10.6	26.6	12.0	43.2	22.4	43.3	26.0	10.4	2.2
Ile	63.7	N.D.	tr	N.D.	70.4	N.D.	111.6	N.D.	118.7	N.D.	tr	N.D.
Trp	21.7	N.D.	tr	N.D.	29.2	N.D.	35.4	N.D.	34.3	N.D.	N.D.	N.D.
Leu	46.5	N.D.	20.2	N.D.	138.5	N.D.	246.7	N.D.	262.6	tr	tr	N.D.
Phe	1.3	N.D.	tr	N.D.	37.2	N.D.	90.3	N.D.	97.8	N.D.	tr	N.D.
Lys	175.2	N.D.	25.5	N.D.	tr	N.D.	66.6	N.D.	62.8	N.D.	tr	tr
Total contents	2160.5	144.3	479.0	196.4	1207.5	144.7	2248.8	230.9	2322.5	187.6	66.8	12.3

tr is below the detection limit. Calculated values are rounded to the second decimal place

全ての乳発酵飲料(#12～#17)において、黒酢・純米酢、清酒と比較して、L-アミノ酸の含有量は低い値を示しました。しかしながら、D-アミノ酸含有量は多くの乳発酵飲料において、高い値を示しました。

■ 各発酵食品・飲料中の総アミノ酸含有量と D/L 比

各発酵食品・飲料を分析して得られた各 DL-アミノ酸の定量値を基に、総アミノ酸含有量および D/L 比を算出しました。

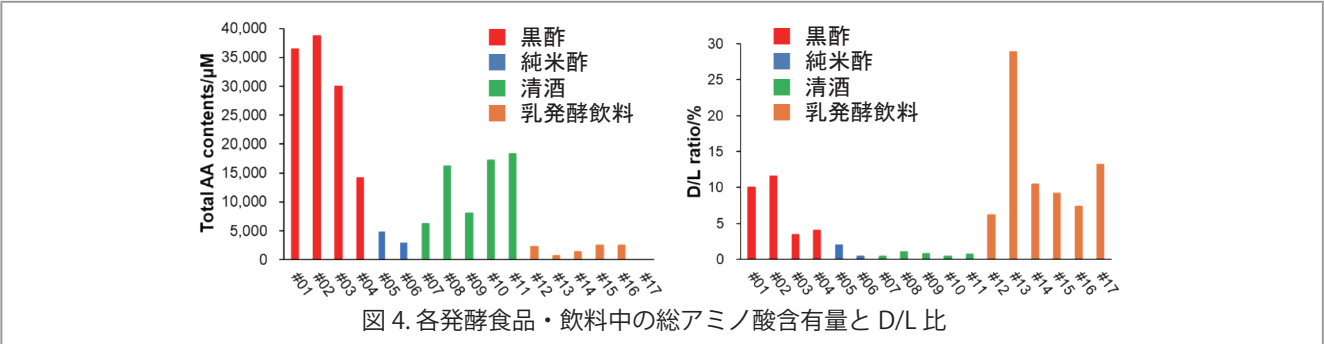


図 4. 各発酵食品・飲料中の総アミノ酸含有量と D/L 比

総アミノ酸含有量は黒酢 > 清酒 > 純米酢 > 乳発酵飲料の順に、また D/L 比は乳発酵飲料 > 黒酢 > 純米酢 > 清酒の順に高いことが示されました。

■ ラベル化したサンプルの長期安定性

ラベル化した直後のサンプルを HPLC で分析し、得られたピーク面積の値を基準に、1 日後と 7 日後のピーク面積の値からサンプルの安定性を以下の方法で評価しました。

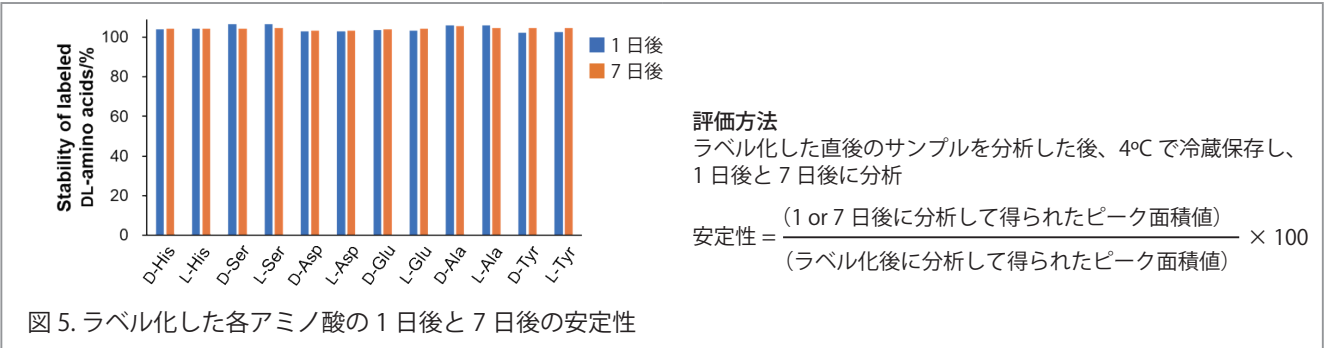


図 5. ラベル化した各アミノ酸の 1 日後と 7 日後の安定性

その結果、1 日後と 7 日後ともにピーク面積値は減少していないことが確認されました(図 5)。本結果から、ラベル化したサンプルは冷蔵(4℃)で長期間保存可能であることが示されました。

■ 参考文献

● 発酵食品・飲料中の DL-アミノ酸の一斉分析
Journal of Chromatography B. 2024;1244:124239. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2024.124239>

● アミロイドβ中の Asp 残基のラセミ化・異性化の同定
Analyst. 2023;148:1209-1213. <https://doi.org/10.1039/D2AN01885C> ※ Selected as HOT Article 2023 and featured on front cover

● ペプチド中のエピメリ化したアミノ酸の同定
Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2022;414:4039-4046. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04048-w>

■ 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
DL-アミノ酸ラベル化キット	SP (高速液体 クロマトグラフ用)	19942-74	100 tests	30,000
コスモコア 2.6C ₁₈ パックドカラム		12614-71	2.1 mm I.D. × 100 mm	93,000
ギ酸 劇		08965-82	25 mL	5,450
アセトニトリル 劇		00430-41	1 L	8,000
クロロホルム 劇		08426-71	1 L	4,800
メタノール 劇		21929-81	1 L	2,000
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 セプトム	島津ジーエルシー	GLCTV-807	100 個	2,900

COSMOSIL COSMOCORE
コスモシル、コスモコア 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。

※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 2024 年 9 月現在のものです(消費税は含まれていません)。

ご注意 試験・研究用以外には使用しないでください。



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
TEL: 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