

COSMOSIL

COSMOSIL PBr

C<sub>18</sub> カラムでは分離困難な食肉に含まれる高親水性のイミダゾールジペプチドの高速分析

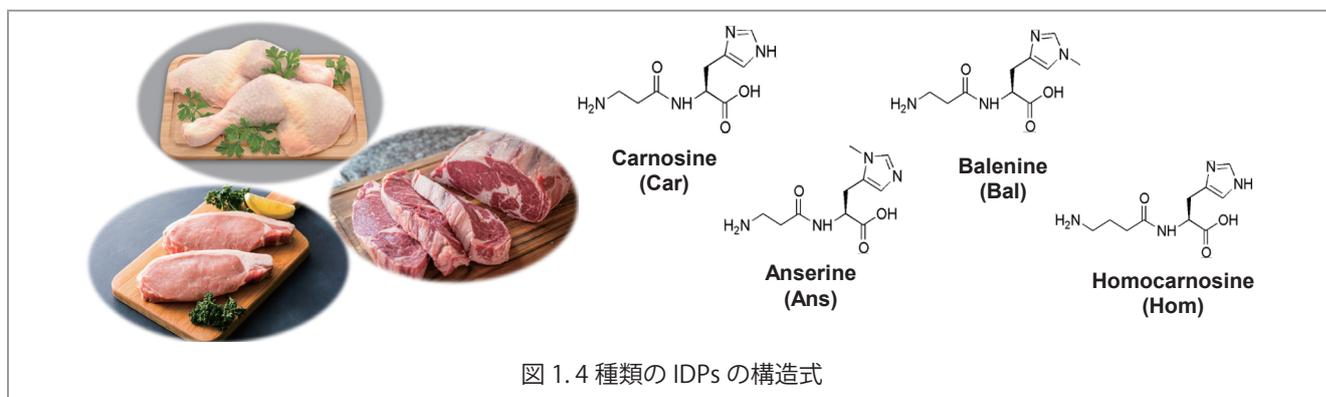
Technical Note  
35

## はじめに

食肉中に含まれている抗酸化作用や抗疲労効果を有するイミダゾールジペプチド(IDPs)を、コスモシール PBr カラムを用いてシングル四重極質量分析計(LC-MS)で高速分析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. 2025;1262:124660.](#)に掲載されています。本研究は、京都大学大学院 農学研究科 応用生物科学専攻 動物栄養科学分野 友永 省三 助教との共同研究成果です。

## IDPs について

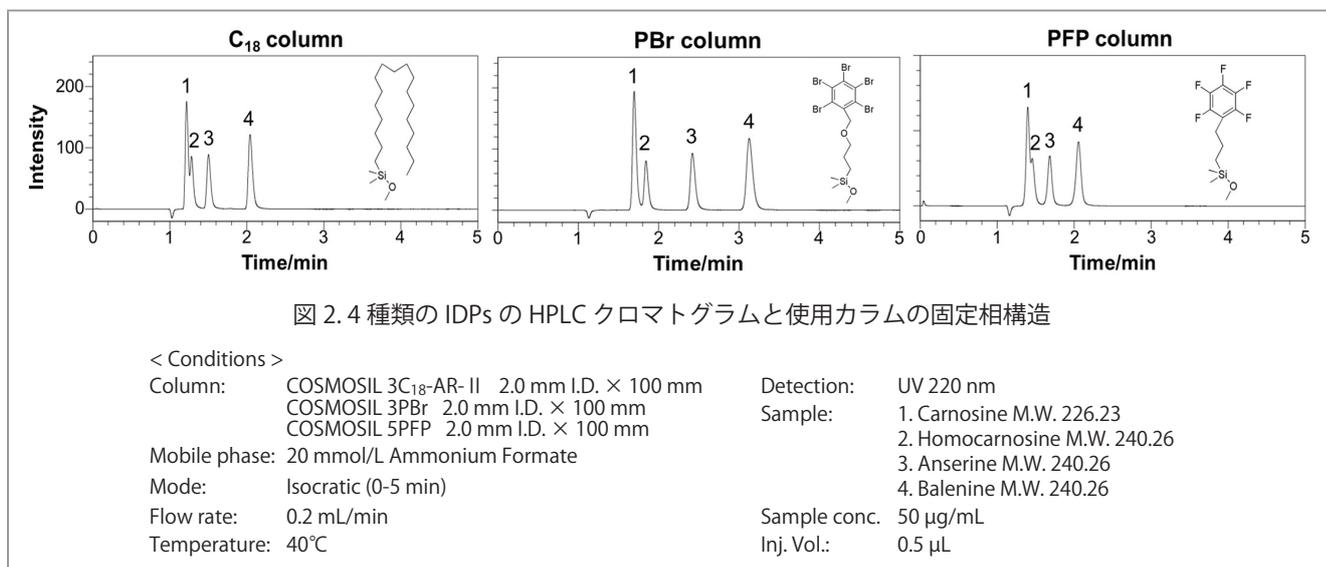
IDPs は、イミダゾール基をもつヒスチジンが結合したジペプチドの総称であり、代表的な IDPs として、カルノシン、アンセリン、バレニンおよびホモカルノシンが知られています(図 1)。IDPs は、哺乳類や鳥類、魚類の筋肉組織中に存在し、抗酸化作用や抗疲労作用などの機能を有する成分として注目されており、健康食品素材としても広く市場に流通しています。そのため、食品中の IDPs をハイスループットに分析する技術の確立が求められています。



IDPs は親水性が高いことから、C<sub>18</sub> カラムを用いた逆相モードでは分析することが難しく、HILIC モードでの分析やラベル化法(誘導体化法)での分析例が報告されています。しかし、HILIC モードは分離機構が C<sub>18</sub> カラムと異なることから条件設定が煩雑であり、ラベル化法は工程が多く、分析までに時間を要することから、いずれもハイスループット分析には適していません。弊社では、コスモシール PBr カラムを用いたさまざまな親水性化合物の一斉分析に成功していることから<sup>1,2)</sup>、コスモシール PBr カラムを用いて逆相モードで食肉中の IDPs の高速分離・定量を試みました。

1) Analytical Biochemistry. 2022;655:114837. 2) MethodsX. 2023;10:102061.

## C<sub>18</sub> カラムと PBr カラム、PFP カラムを用いた IDPs の分離能の比較



C<sub>18</sub> カラムや PFP カラムでは保持が小さく、4 種類の IDPs を分離することはできませんでした(図 2)。一方、PBr カラムは、高親水性の IDPs を保持し、ベースライン分離することができました(Rs > 1.5、図 2)。

## ■ LC-MS を用いた IDPs の分離・検出条件の最適化

食肉中には高濃度の IDPs が含まれることから、カラムサイズや脱溶媒温度を変更し、分離・検出条件を最適化しました。

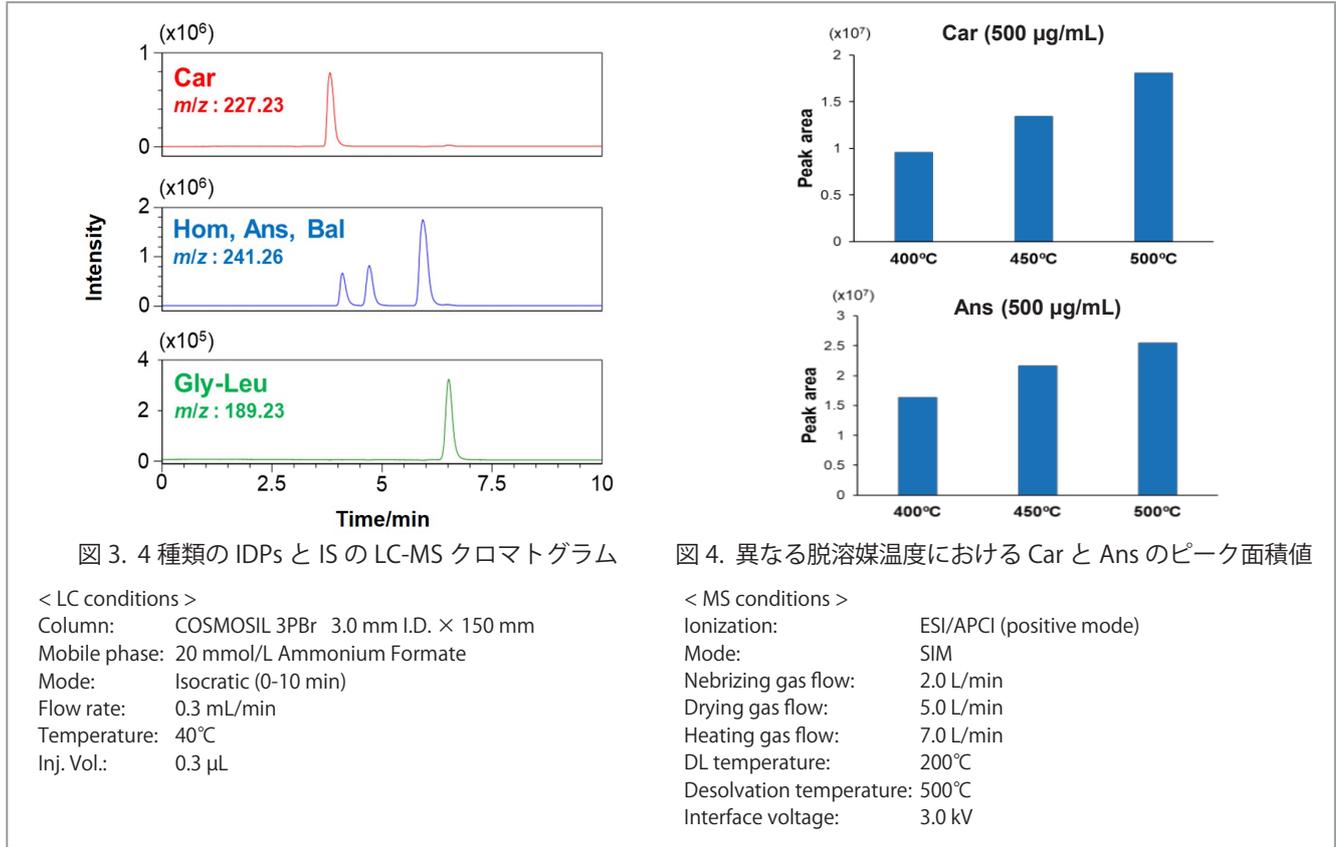


図 3. 4 種類の IDPs と IS の LC-MS クロマトグラム

図 4. 異なる脱溶媒温度における Car と Ans のピーク面積値

< LC conditions >

Column: COSMOSIL 3PBr 3.0 mm I.D. × 150 mm  
 Mobile phase: 20 mmol/L Ammonium Formate  
 Mode: Isocratic (0-10 min)  
 Flow rate: 0.3 mL/min  
 Temperature: 40°C  
 Inj. Vol.: 0.3 µL

< MS conditions >

Ionization: ESI/APCI (positive mode)  
 Mode: SIM  
 Nebulizing gas flow: 2.0 L/min  
 Drying gas flow: 5.0 L/min  
 Heating gas flow: 7.0 L/min  
 DL temperature: 200°C  
 Desolvation temperature: 500°C  
 Interface voltage: 3.0 kV

カラムサイズを 3.0 mm I.D. × 150 mm、流速を 0.3 mL/min にすることで、4 種類の IDPs と内部標準 (IS) である Glycyl-L-leucine (M.W. 188.23) を 10 分以内で良好に分離することができました (図 3)。また、高濃度の IDPs を MS で分析する際、脱溶媒温度が低温であるとサチュレーションを起こす可能性があることから、異なる脱溶媒温度における高濃度の Car と Ans のピーク面積値を比較したところ、脱溶媒温度が 500°C の時に MS 感度は最も高くなり、サチュレーションも生じないことが確認できました (図 4)。

## ■ PBr カラムを用いた IDPs の分析法バリデーション

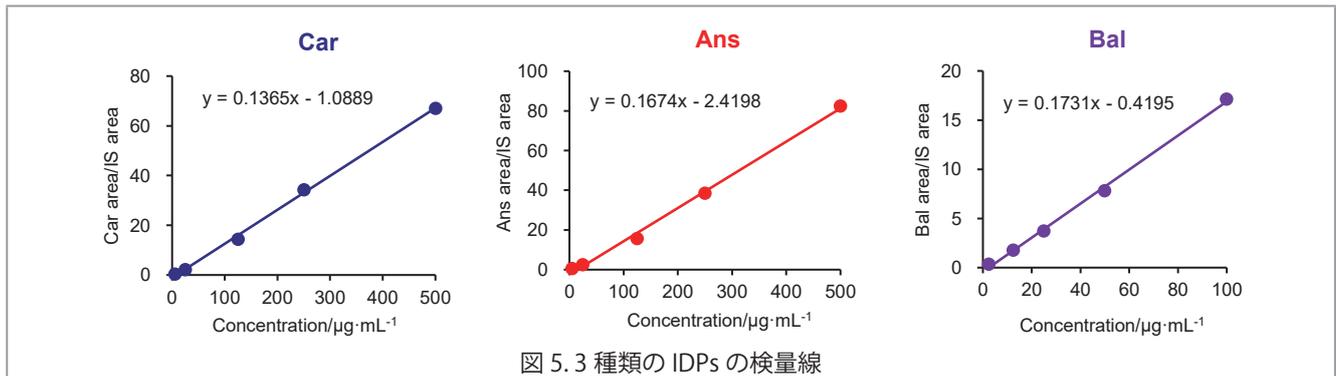


図 5. 3 種類の IDPs の検量線

表 1.3 種類の IDPs の検量線範囲と  $R^2$ 、定量下限値 (LOQ)、添加回収率 (N=4)、マトリクス効果 (N=5)

Analyte	Calibration range	$R^2$	LOQ	Recovery			Matrix effect		
				Low	Middle	High	Beef	Pork	Chicken
Car	5 ~ 500 µg/mL	0.9985	2.34 µg/mL	100.0%	113.5%	113.3%	95.5%	97.9%	102.6%
Ans	5 ~ 500 µg/mL	0.9968	1.16 µg/mL	108.4%	109.0%	107.9%	109.6%	108.5%	103.4%
Bal	2.5 ~ 100 µg/mL	0.9980	0.50 µg/mL	106.2%	106.5%	103.4%	105.1%	104.5%	106.5%

※ 「LC-MS を用いた IDPs の分離・検出条件の最適化」にて最適化した条件で測定しました。

※ 検量線サンプルは実サンプルと同様の方法で前処理をしています。(各成分の濃度は 400 µL の標準サンプルに、エタノール 3.6 mL を添加した後の濃度で計算)

※ 筋肉組織中に含まれる Homocarnosine は微量であることから、本実験では分析していません。

各化合物のピーク面積値を IS のピーク面積値で補正したところ、直線的な検量線を作成することができました (図 3、表 1)。また、Car と Ans、Bal 含有量が比較的多かった豚ヒレ肉を用いて添加回収試験を行ったところ、各 IDPs の回収率は 100.0% ~ 113.5% でした (表 1)。牛ヒレ肉と豚ヒレ肉、鶏ムネ肉を用いて、マトリクス効果を算出したところ、95.5% ~ 109.6% であり、イオン抑制効果およびイオンエンハンスメントの影響はないことが示されました (表 1)。

## ■ サンプルの前処理

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。

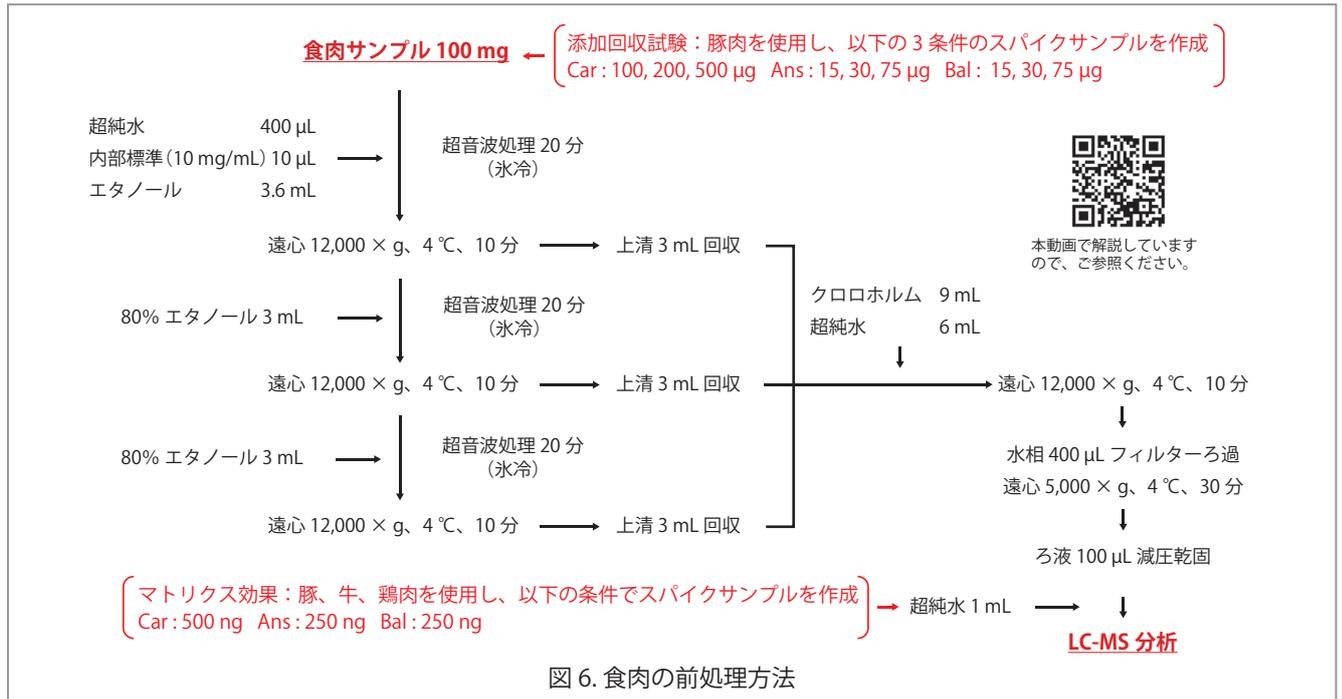
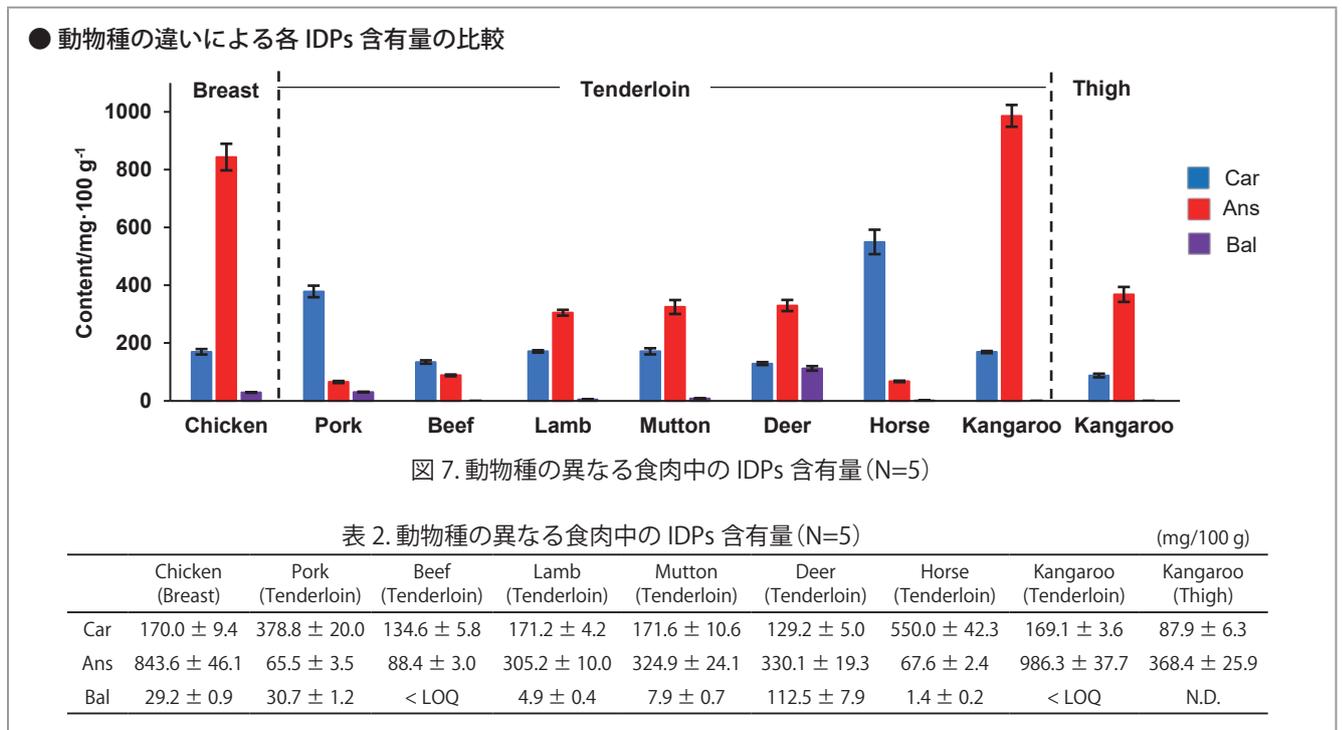


図 6. 食肉の前処理方法

エタノールとクロロホルムを用いた液-液抽出により、食肉中の夾雑成分を除去しました(図 6)。IDPs の抽出効率を上げるため、抽出処理を 3 回行っています。

## ■ 食肉に含まれる IDPs の定量

動物種の違いによって含まれる IDPs の量や種類が異なることが知られていることから、さまざまな食肉を用いて IDPs の定量分析を行いました。本分析では、IDPs の含有量が多いことが知られている鶏ムネ肉のほかに、7 種類の陸上動物のヒレ肉を分析しました。(カンガルーのみモモ肉も分析)



LC-MS 分析により得られたピーク面積値と検量線の値から、各食肉サンプル中に含まれる成分の含有量を算出した結果、Car 含有量は馬肉が、Ans 含有量はカンガルーのヒレ肉が、Bal 含有量は鹿肉が最も高い値を示しました(図 7、表 2)。カンガルー肉に関して、モモ肉中に含まれる IDPs 含有量を算出したところ、ヒレ肉と比べて低い値を示しました(表 2)。同じ動物種であっても組織によって IDPs 含有量に大きな違いがあることは、Technical Note 34 でご紹介している研究結果と一致しています<sup>3)</sup>。

3) Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2024;72:27538-48.

● 動物種の違いによる IDPs 総含有量の比較

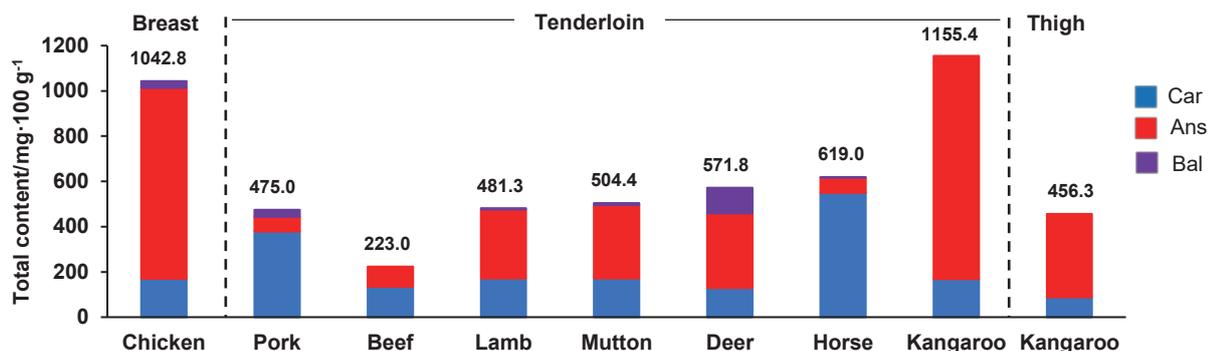


図 8. 動物種の異なる食肉中の IDPs の総含有量

表 3. 動物種の異なる食肉中の IDPs 含有量の相対標準偏差 (RSD) (%)

	Chicken (Breast)	Pork (Tenderloin)	Beef (Tenderloin)	Lamb (Tenderloin)	Mutton (Tenderloin)	Deer (Tenderloin)	Horse (Tenderloin)	Kangaroo (Tenderloin)	Kangaroo (Thigh)
Car	5.54	5.29	4.29	2.44	6.18	3.88	7.70	2.15	7.21
Ans	5.47	5.30	3.91	3.27	7.43	5.84	3.55	10.68	7.03
Bal	4.29	3.41	N/A*	8.18	9.27	7.06	14.95	N/A*	N/A*

\* Bal 含有量が LOQ 以下および N.D. のため、RSD を算出できませんでした。

IDPs 総含有量は、カンガルー肉 (ヒレ肉) > 鶏肉 > 馬肉 > 鹿肉 > マトン肉 > ラム肉 > 豚肉 > カンガルー肉 (モモ肉) > 牛肉の順に高いことが示されました (図 8)。全ての食肉サンプルにおいて、IDPs は相対標準偏差 (RSD) < 15% で精度よく分析できました (表 3)。また鶏肉を用いて、各 IDPs の日内再現精度 (併行精度) および日間再現性を評価したところ、いずれも RSD < 15% で精度良く分析できました。(詳細は論文をご参照ください) 確立した本分析系を用いることで、生体サンプルに含まれる IDPs も迅速に定量可能になることが期待できます。

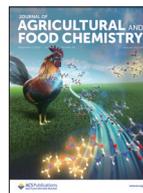
■ 参考文献

● 食品に含まれる親水性化合物 (ニコチンアミド代謝物) の分析

Analytical Biochemistry. 2022;655:114837. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114837>  
MethodsX. 2023;10:102061. (オープンアクセス) <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102061>

● 食肉に含まれるイミダゾールジペプチドとその構成アミノ酸、タウリンの一斉分析

Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2024;72:27538-48.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c07391> ※ Featured on Supplementary Cover



Supplementary Cover のカバーアート

■ 本研究で使用した製品

分類	用途	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
カラム	分析	コスモシール 3PBr パックドカラム	SP (高速液体クロマトグラフ用)	19352-91	3.0 mm I.D. × 150 mm	68,000
試薬	標準品	L-カルノシン	GR	22496-21	1 g	4,000
		L-アンセリン	GR	22533-92	25 mg	30,000
		L-バレニン	GR	22491-42	25 mg	30,000
試薬	移動相	アセトニトリル	劇 SP (高速液体クロマトグラフ用)	00430-41	1 L	8,000
		ギ酸アンモニウム	GR	02509-55	500 g	3,200
試薬	サンプル前処理	エタノール	SP (高速液体クロマトグラフ用)	14741-41	1 L	5,300
		滅菌水	SP (バイオテクノロジーグレード)	06442-95	500 mL	2,300
		クロロホルム	劇 SP (高速液体クロマトグラフ用)	08426-71	1 L	4,800
器具	サンプル前処理	コスモスピンフィルター H(0.45 ミクロン)	—	06540-34	100 pkg	41,500
		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 セプタム	島津ジーエルシー	GLCTV-807	100 個	2,900

COSMOSIL コスモシール 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 2025 年 5 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。

**nacalai tesque**  
The quality for certainty.



● URL  
<https://www.nacalai.co.jp/>

● 価格・納期のご照会  
試薬はご注文  
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

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