

LC-FLによる37成分のD/L-アミノ酸分析の自動化と酒類への応用

岩田 奈津紀

ユーザーベネフィット

- ◆ 37成分のD/L-アミノ酸を短時間に簡単な操作で分離定量可能です。
- ◆ 20試料あたりに要する作業時間や労力を1時間以上削減できます。
- ◆ 誘導体化反応時間の一定化により、再現性の高い結果が得られます。

■はじめに

アミノ酸は、L体およびD体の鏡像異性体（ただし、不斉炭素を分子内に持たないグリシンを除く）を持ちます。L-アミノ酸とは対照的に、D-アミノ酸に関する研究は少なく、食品や食材の呈味性、保存性、香気性などに対するD-アミノ酸の役割は最近までほぼ不明でした。しかしながら、最近では発酵食品や生体試料には、多くのL-アミノ酸以外に数種のD-アミノ酸が含まれていることが知られるようになり、それに伴ってアミノ酸のD/L分離の需要が高まっています。さらに、D-アミノ酸はL-アミノ酸に比べ食品中や生体内において微量であるため、高濃度に存在するL-アミノ酸と分離し定量することが求められます。

本稿では、キラル構造を持つ誘導体化試薬を用いて、ジアステレオマーにしたD/L-アミノ酸を逆相モードで分離し、蛍光検出した結果をご紹介します。併せて、誘導体化および分析の自動化検討についてもご紹介します。

■キラル誘導体化

キラル誘導体化するために、*N*-アセチル-L-システイン（NAC）と*N*-イソブチリル-L-システイン（NIBC）の2種類のキラルチオールを用いました。NACあるいはNIBCの存在下で、*o*-フタルアルデヒド（OPA）を反応させることにより、D/L-アミノ酸をジアステレオマー蛍光誘導体化しました。

■LCによるD/L-アミノ酸分析

一般に、D/L-アミノ酸をHPLCで分析する際には、単一の分析条件では全ての成分の分離が困難なため、LC/MSや二次元LCなどが用いられます。しかしながら、LC/MS分析は、マトリクス効果の影響を受けやすく、他のLCの検出器に比べ、定量性に乏しい問題点があります。また、二次元LC法では、長時間の分析を要することが知られています。そのため、短時間に簡単な操作で分離定量する手法が求められています。

また、食品中のD/L-アミノ酸を分析する際には、高濃度に存在するL-アミノ酸や夾雑成分と高分離分析するため、

微粒子カラムを用います。それに伴い、システム負荷圧は高くなるため、本稿では、システム耐圧130 MPaを備えるNexera X3を用いました。

■分析条件と自動化検討

対象成分は、D/L-アミノ酸37成分（タンパク構成アミノ酸のうち、D/L-プロリンを除く）です（表1）。なお、表の背景色は、誘導体化試薬の種類を表しています。つまり、赤色、青色はそれぞれOPA/NAC誘導体化、OPA/NIBC誘導体化したアミノ酸であることを示しています。

図1に自動化システムの模式図を示します。本検討では、送液ポンプの移動相ブレンド機能を用いて移動相を自動調製し、併せて、2種類の分析条件を自動で切り替えました。また、オートサンプラーの自動前処理機能を用いてD/L-アミノ酸の誘導体化を行いました。表2に示す2つの分析条件の異なる点は、移動相の有機溶媒比率とグラジエントタイムプログラムです（太字部分）。前述の移動相ブレンド機能を用いれば、有機溶媒の原液をセットするだけで指定した混合比率で送液可能です。この機能は分析時だけでなく、分析条件切換時に必要な移動相置換の際にも応用できるため、労力だけでなく作業時間も削減できました。また、自動前処理機能を用いれば、OPA/NAC溶液、OPA/NIBC溶液および試料を入れたバイアルをオートサンプラーにセットするだけで、ニードル内で自動的に混合する前処理プログラムを実行できるため、誘導体化された試料をそのまま分析に供しました（表3、4）。図2に当社ワークステーション LabSolutions™における前処理プログラムの設定画面を示します。このように、オートサンプラーによる自動プレカラム蛍光誘導体化を行うことで、手動による煩雑な前処理が不要になり、誘導体化から分析開始までの時間を一定にできました。また、誘導体化を行うバイアルも不要となるため、コストダウンが図れました。

今回20試料を分析したところ、手動に比べ作業時間や労力を合計1時間以上削減できました（表5）。なお、本稿の分析は、図1に示したようにシンプルな装置構成で実現可能です。

表1 対象成分

1	D-Asp	8	D-Arg	15	D-Ile	22	L-Ser	29	L-Tyr	36	L-Leu
2	D-Glu	9	D-Ala	16	D-Phe	23	L-Gln	30	L-Val	37	L-Lys
3	D-Asn	10	D-Tyr	17	D-Leu	24	L-His	31	L-Met		
4	D-Ser	11	D-Val	18	D-Lys	25	L-Thr	32	L-(Cys) ₂		
5	D-Gln	12	D-Met	19	L-Asp	26	Gly	33	L-Trp		
6	D-His	13	D-(Cys) ₂	20	L-Glu	27	L-Arg	34	L-Ile		
7	D-Thr	14	D-Trp	21	L-Asn	28	L-Ala	35	L-Phe		

※ 背景色（赤：OPA/NAC誘導体化、青：OPA/NIBC誘導体化）

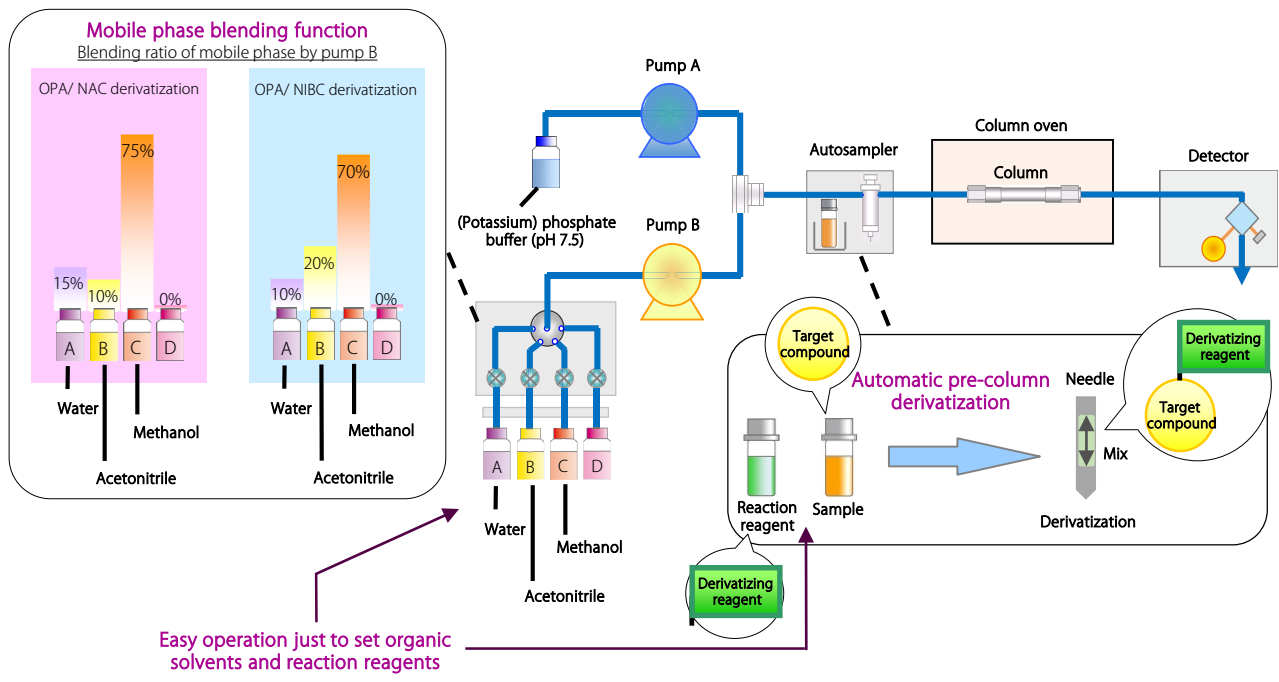


図1 移動相ブレンド機能と自動プレカラム誘導体化

表2 分析条件

System	: Nexera X3	
Column	<OPA/NAC derivatization> Shim-pack Scepter™ 1.9 μm C8*1 (150 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm)	<OPA/NIBC derivatization> Shim-pack Scepter 1.9 μm C8 (150 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm)
Flow rate	: 0.6 mL/min	
Mobile phase	: <Pump A> 10 mmol/L (Potassium) phosphate buffer (pH 7.5)* <Pump B> mobile phase blending A) Water B) Acetonitrile C) Methanol A/B/C=15:10:75	
Time program	4%B (0-3 min)→11%B (13 min)→14%B (22 min)→ 25%B (30 min)→30%B (35 min)→41%B (61 min)→ 80%B (61.01-63 min)→4%B (63.01-67 min)	10%B (0 min)→15%B (3-15 min)→20%B (25 min)→ 52%B (57 min)→80%B (57.01-59 min)→10%B (59.01-63 min)
Column temp.	: 35 °C	
Injection volume	: 1 μL	
Vial	: SHIMADZU LabTotal™ for LC 1.5 mL, Glass*2	
Detection (FL)	: RF-20AXS, Ex: 350 nm, Em: 450 nm	

* 1 P/N: 227-31034-04, * 2 P/N: 227-34001-01

※ Add 0.68 g of potassium dihydrogen phosphate and 2.61 g of dipotassium hydrogen phosphate into 2000 mL of ultrapure water, and dissolve completely.

表3 オートサンプラーによる自動プレカラム誘導体化の概要

<OPA/NAC derivatization>	<OPA/NIBC derivatization>
① OPA/NAC solution 4 μL	① OPA/NIBC solution 4 μL
② Sample 1 μL	② Sample 1 μL
③ Mix	③ Mix
④ Injection	④ Injection

表4 誘導体化試薬の調製

OPA reagent	Add 0.3 mL of ethanol into 10 mg of <i>o</i> -phthalaldehyde and dissolve completely. Then add 0.7 mL of 0.1 mol/L borate buffer and 4 mL of ultrapure water.
0.1 mol/L borate buffer	Add 0.62 g boric acid and 0.20 g of sodium hydroxide into 100 mL of ultrapure water, and dissolve completely.
NAC solution	Add 20 mg of <i>N</i> -acetyl-L-cysteine into 10 mL of 0.1 mol/L borate buffer.
NIBC solution	Add 20 mg of <i>N</i> -isobutryl-L-cysteine into 10 mL of 0.1 mol/L borate buffer.
OPA/NAC solution	Mix equal volume of OPA reagent and NAC solution.
OPA/NIBC solution	Mix equal volume of OPA reagent and NIBC solution.

表5 自動と手動の比較 (20試料の分析)

		Automatic		Manual	
Mobile phase preparation	Buffer		5 min		
	Organic solvent	○	0 min ※Mobile phase blending function	×	10 min
Mobile phase replace with switching analytical conditions		○	0 min ※Mobile phase blending function	×	10 min
Derivatizing reagent preparation			10 min		
Derivatization		○	0 min ※Automatic pre-column derivatization	×	50 min
Total		○	15 min	×	85 min

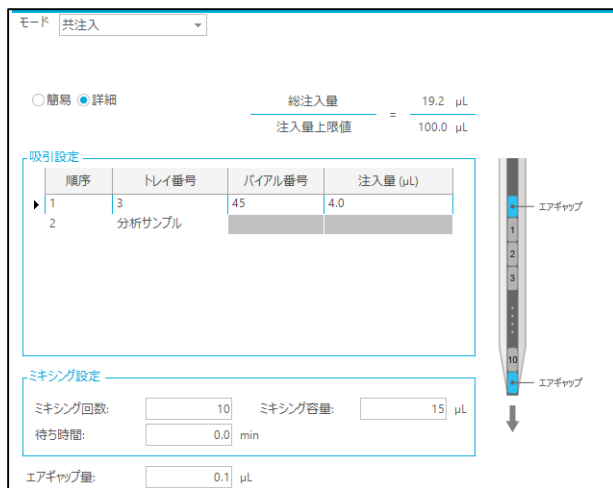


図2 前処理プログラムの設定画面

■ D/L-アミノ酸標準溶液の分析

図3にD/L-アミノ酸標準溶液（各5 µmol/L）のクロマトグラムを示します。2種類のキラルチオールを用いることにより、合計約120分で37成分を分離できました。

■ 再現性

各2 µmol/Lの標準溶液について、6回繰り返し分析における保持時間と面積の再現性（%RSD）を確認しました。保持時間、面積ともに再現性はそれぞれ0.1%以下、1.5%以下の結果が得られました（表6）。

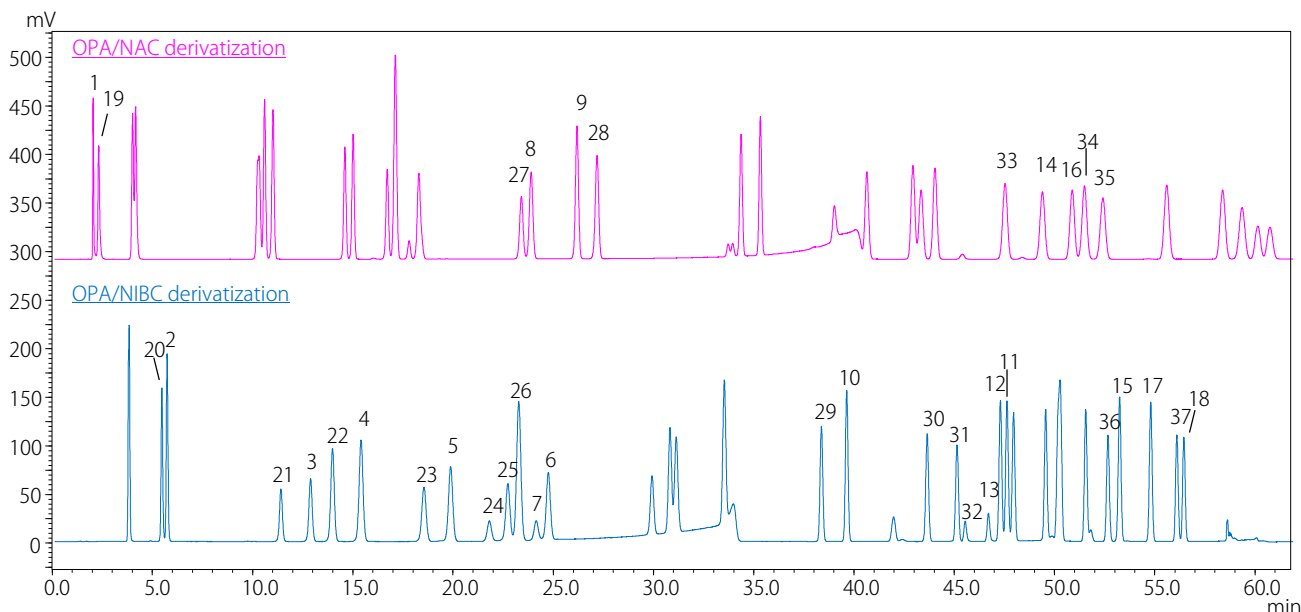


図3 D/L-アミノ酸標準溶液（各5 µmol/L）のクロマトグラム

表6 再現性（%RSD、n=6）

Compound	Retention time	Area	Compound	Retention time	Area	Compound	Retention time	Area
1 D-Asp	0.23	1.50	14 D-Trp	0.05	0.42	27 L-Arg	0.02	0.18
2 D-Glu	0.09	0.47	15 D-Ile	0.02	0.38	28 L-Ala	0.03	0.54
3 D-Asn	0.09	0.29	16 D-Phe	0.06	0.51	29 L-Tyr	0.02	0.28
4 D-Ser	0.10	0.19	17 D-Leu	0.02	0.30	30 L-Val	0.01	0.37
5 D-Gln	0.09	0.26	18 D-Lys	0.02	0.50	31 L-Met	0.01	0.35
6 D-His	0.07	0.40	19 L-Asp	0.35	1.32	32 L-(Cys) ₂	0.02	0.62
7 D-Thr	0.06	0.25	20 L-Glu	0.09	0.44	33 L-Trp	0.05	0.44
8 D-Arg	0.02	0.19	21 L-Asn	0.09	0.26	34 L-Ile	0.06	0.72
9 D-Ala	0.03	0.49	22 L-Ser	0.10	0.19	35 L-Phe	0.06	0.52
10 D-Tyr	0.01	0.28	23 L-Gln	0.10	0.29	36 L-Leu	0.02	0.31
11 D-Val	0.02	0.62	24 L-His	0.06	0.40	37 L-Lys	0.02	0.43
12 D-Met	0.02	0.35	25 L-Thr	0.07	0.35			
13 D-(Cys) ₂	0.02	0.38	26 Gly	0.07	0.41			

※背景色（赤：OPA/NAC誘導体化、青：OPA/NIBC誘導体化）

■ 検量線

対象の37成分について検量線を作成したところ、いずれの成分においても寄与率 $r^2=0.999$ 以上と良好な直線性が得られました。図4に検量線の一例を、表7に検量線濃度範囲と寄与率を示します。

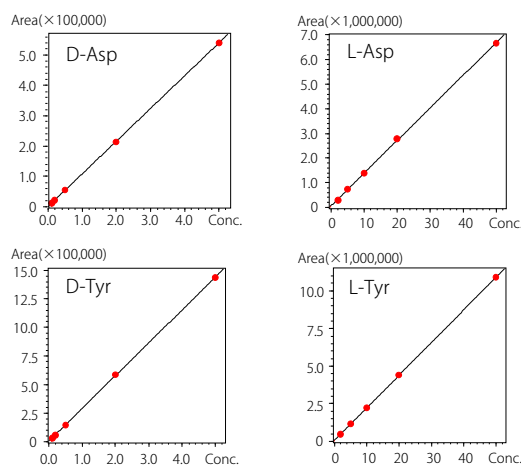


図4 検量線

表7 検量線濃度範囲と寄与率 (r²)

Compound	Conc. range (μmol/L)	r ²	Compound	Conc. range (μmol/L)	r ²
1 D-Asp	0.1-5	0.99997	19 L-Asp	2-50	0.99968
2 D-Glu	0.1-5	0.99986	20 L-Glu	2-50	0.99999
3 D-Asn	0.1-5	0.99992	21 L-Asn	2-50	0.99999
4 D-Ser	0.1-5	0.99997	22 L-Ser	0.5-20	0.99996
5 D-Gln	0.1-5	0.99997	23 L-Gln	0.5-20	0.99995
6 D-His	0.2-50	0.99995	24 L-His	0.2-100	0.99991
7 D-Thr	0.1-5	1.00000	25 L-Thr	0.1-10	0.99957
8 D-Arg	0.1-20	0.99994	26 Gly	0.5-100	0.99996
9 D-Ala	0.1-5	0.99997	27 L-Arg	2-100	0.99993
10 D-Tyr	0.1-5	0.99993	28 L-Ala	5-100	0.99951
11 D-Val	0.1-2	1.00000	29 L-Tyr	2-50	0.99998
12 D-Met	0.1-5	0.99999	30 L-Val	2-50	0.99998
13 D-(Cys) ₂	0.1-5	0.99993	31 L-Met	0.1-5	0.99999
14 D-Trp	0.1-5	0.99996	32 L-(Cys) ₂	2-50	0.99995
15 D-Ile	0.1-5	0.99990	33 L-Trp	2-50	0.99994
16 D-Phe	0.1-5	0.99997	34 L-Ile	0.5-20	0.99987
17 D-Leu	0.1-5	0.99996	35 L-Phe	2-50	0.99991
18 D-Lys	0.1-5	0.99996	36 L-Leu	2-50	0.99999
			37 L-Lys	0.5-20	0.99993

※背景色 (赤: OPA/NAC誘導体化、青: OPA/NIBC誘導体化)

■ 酒類への応用

サンプルは、ビール2種、日本酒および赤/白ワイン (計5種類) を用いました。ビールAおよび日本酒は10mmol/L塩酸水で5倍希釈、ビールBおよび赤/白ワインは10倍希釈した後、0.2 μmのメンブランフィルターでろ過を行いました。

今回試料に用いた5つの酒類全てに含まれていたD-アミノ酸は、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-セリン、D-ヒスチジン、D-アラニン、D-ロイシンでした。また、ワイ

ンにだけ含まれている成分は、D-グルタミン、D-トリプトファンであり、ビールにだけ含まれている成分は、D-フェニルアラニンでした (図5~6)。ビールAはビールBに比べ、D-アミノ酸の含有量が約2倍異なりました。ところが、ビールBのD/L-アミノ酸に対するD-アミノ酸の比率は、ビールAに比べ約2倍高い結果となりました。さらに、L体に比べD体が微量であることも確認できました (図7~8)。

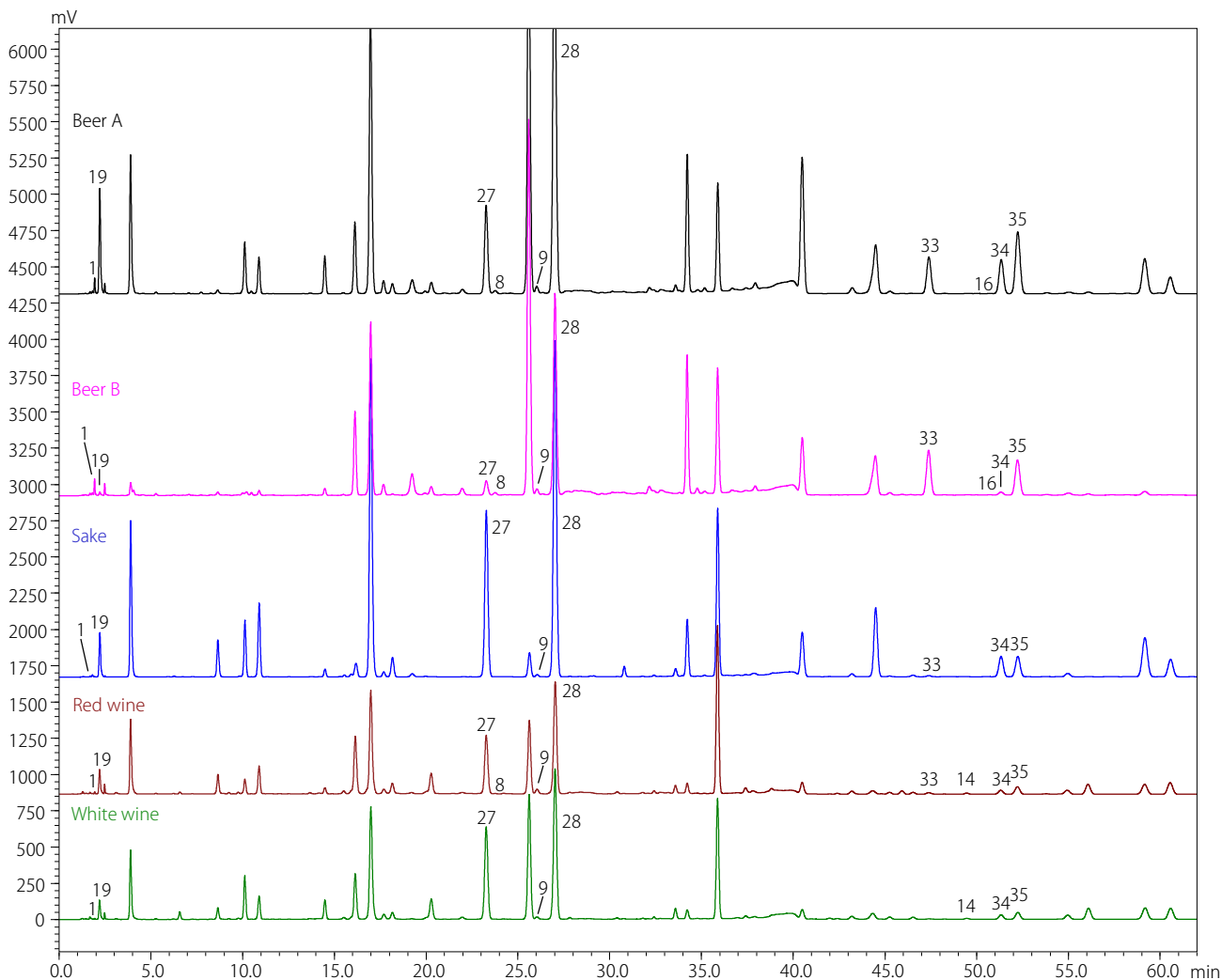


図5 酒類のクロマトグラム (OPA/NAC誘導体化)

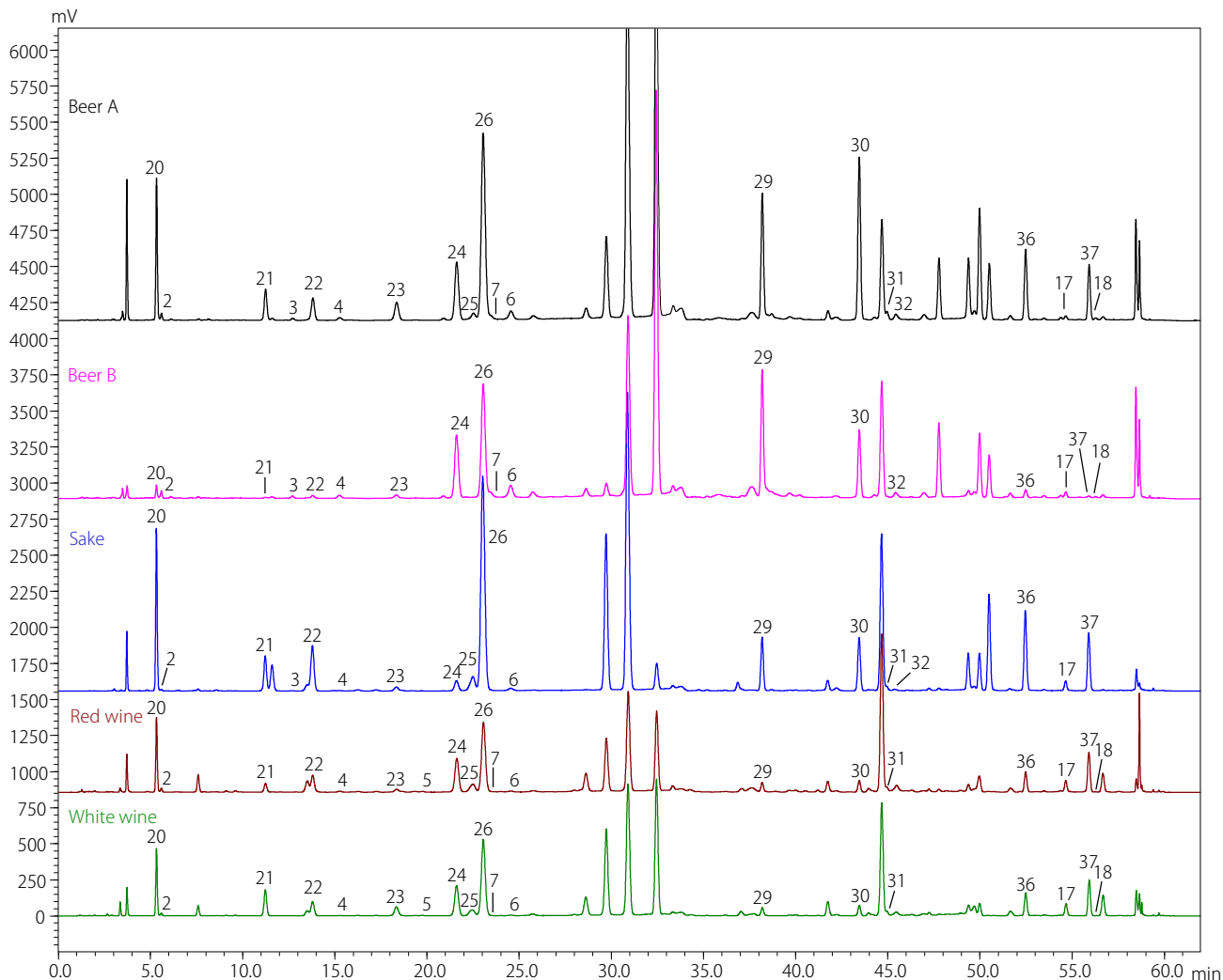


図6 酒類のクロマトグラム (OPA/NIBC誘導体化)

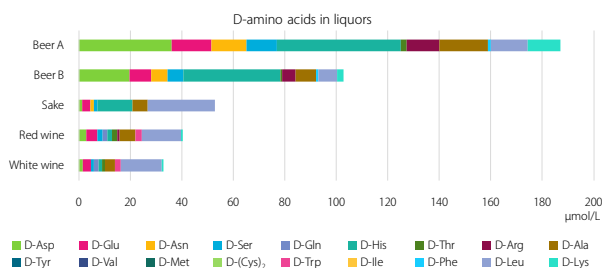
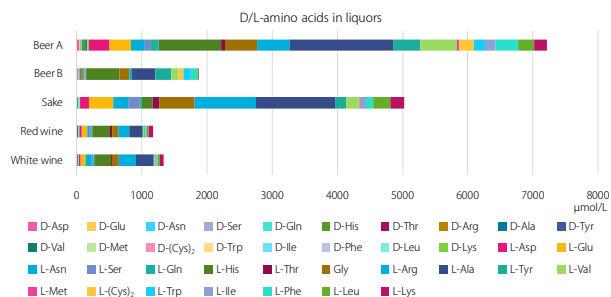


図7 酒類中のD-アミノ酸含有量



※一部のL体は高濃度に含まれていたため、定量範囲外の成分があります。

図8 酒類中のD/L-アミノ酸含有量

■まとめ

キラル構造を持つ誘導体化試薬を用いて、ジアステレオマーにした37成分のD/L-アミノ酸を逆相モードで分離し、蛍光検出しました。

送液ポンプの移動相ブレンディング機能とオートサンプラーの自動前処理機能を用いて、自動化を検討しました。2種類の分析条件を自動で切り換え、実行することで移動相調製、誘導体化反応および移動相置換にかかる時間や労力を合計1時間以上（20試料の分析）削減できました。同時に、誘導体化から分析開始までの時間を一定にできました。

また、2種類のキラルチオールを用いることにより、酒類中のD/L-アミノ酸37成分の分離が可能となりました。酒類中のD-アミノ酸の種類、含有量はお酒の種類により異なり、ビールにおいては種類によってD-アミノ酸の含有量が約2倍異なることがわかりました。さらに、L体に比べD体が微量であることも確認できました。

Nexera、LabSolutions、Shim-pack Scepter、SHIMADZU LabTotalは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。