SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

高速液体クロマトグラフ質量分析計　LCMS™-8060NX

トリプル四重極LC/MS/MSを用いた きのこ（ぶなしめじ）中のオルニチン分析

堀池 秀樹

ユーザーベネフィット

- ◆ LC/MS/MS法により、誘導体化を行うことなくオルニチンの高感度分析 (試料中換算濃度50 mg/kg以下) が可能です。
- ◆ 本システムでは高感度分析に加えて高速分析（13 min）も可能です。

■はじめに

オルニチンは、遊離アミノ酸の1種であり、しじみなどに多く含有され、肝機能の向上などに有効な成分であることが近年広く認知されるようになりました。オルニチンを摂取することにより、疲労回復や睡眠の質の向上、成長ホルモンの分泌促進などの効能が期待されている成分です。オルニチンは、ヒトの体内で生成された有毒物質であるアンモニアを代謝する肝臓のはたらきをサポートする重要な役割を担います。

今回、オルニチン含有量がしじみの５倍以上と言われる「ぶなしめじ」について、令和3年3月31日に農林水産省告示第445号として公示された「きのこ（ぶなしめじ）中のオルニチンの定量-高速液体クロマトグラフ法」の日本農林規格(JAS0016)※に従い、LCMS-8060NXを使用して分析した例をご紹介します。

※本JAS規格の制定に際して、(株)島津製作所も試験室間共同実験に協力させて頂きました。

■前処理

前処理のスキームを図１に示します。ぶなしめじを均一に粉砕し、希塩酸を用い抽出する比較的簡便な操作となります。今回は、内標物質としてテアニンを用いました。

ホモジナイズ	石づきを除去 均一に粉砕
抽出①	2 gをはかり取る 希塩酸 15 mL添加 振とう 15 min
定容	50 mLフラスコを使用 希塩酸 を用いて定容
分離・抽出②	15 mLを遠心用容器に移す 遠心分離(13000×g) 10 min 上澄み液をフィルターろ過
内標物質添加	抽出液 を一律100倍希釈後 内標テアニンを添加
試験用試料	LC/MS/MS測定

図1　試料の前処理

■分析条件

JAS0016に準拠した分析条件を表１に示します。

表１　分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™)	
Column	: Shim-pack™ GIST Amide (100 mm × 2.1 mm, 3.0 µm, P/N: 227-30818-04)
Mobile phases	: A) 0.3% formic acid in water B) 0.3% formic acid in acetonitrile
Gradient program	: B.conc 90% (0 min) - 50% (5 -8min) - 90% (8.01 - 13 min)
Flow rate	: 0.30 mL/min
Column temp.	: 40 ℃
Injection volume	: 0.5 µL
[MS conditions]　(LCMS-8060NX)	
Ionization	: ESI Positive
Interface voltage	: +4.kV
IonFocus voltage	: +2 kV
Interface temp.	: OFF
Nebulizing gas flow	: 2 L/min
Drying gas flow	: 10 L/min
Heating gas flow	: 10 L/min
DL temp.	: 200 ℃
Heat block temp.	: 400 ℃
Interface temp.	: OFF
Probe position	: +3 mm
MRM transition	: Ornithine　(-)*m/z* 133>70　CE -22 V Theanine　(+)*m/z* 175>84　CE -21V

■標準試料のMRMクロマトグラム

内標物質テアニンを添加したオルニチン標準液のMRMクロマトグラムを図2に示しました。当分析条件でおいて、オルニチンは 5 min付近、テアニンは 3.5 min付近にそれぞれ分離し、溶出しました。

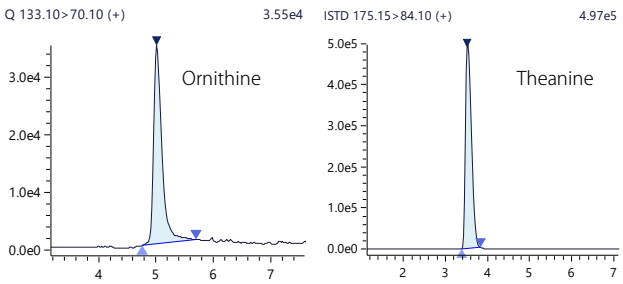


図2　MRMクロマトグラム
（Ornithine，Theanine 各20 ng/mL）

■検量線 (内部標準法)

テアニンを内標物質をとして使用した内部標準法による検量線を図３に示します。検量線範囲 20〜2,000 ng/mLにおいて、相関係数R>0.9999と良好な直線性が得られました。

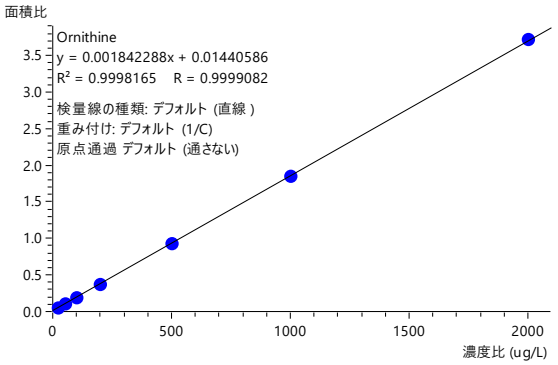


図3　内部標準法によるオルニチンの検量線（7点）
（Ornithine 20〜2,000 ng/mL）

■市販のぶなしめじ中のオルニチン定量結果

市販のぶなしめじを前処理して得られた試験用試料(100倍希釈) 5点のMRMクロマトグラムを図4に示しました。また、その定量結果を表2に併せて示しました。

しじみ中のオルニチン含有量は、おおよそ100〜150mg/kgと言われています。今回の測定結果では、ぶなしめじ中のオルニチン含有量は、779〜2,198mg/kgとなりました。

ぶなしめじには、しじみのおおよそ7〜14 倍ものオルニチンを含有することがわかります。

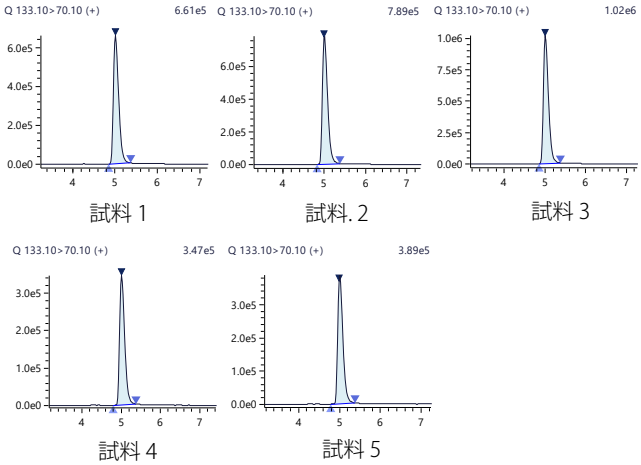


図４　試験用試料5点の各MRMクロマトグラム

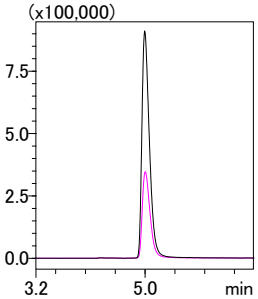
表2　試験用試料の各定量値（ぶなしめじ含有濃度に換算）

単位：mg/kg

試料 No.	1	2	3	4	5
含有濃度	1,427	1,782	2,198	779	832

■妥当性評価試験

ぶなしめじ試験用試料を用い、添加回収試験を行いました。試料 1〜3 の3点へ、それぞれオルニチン添加濃度が50 ng/mLになるよう標準液を添加しました。測定により得られたMRMクロマトグラムおよび添加回収結果を図5に示しました。



単位：ng/mL

試料	添加濃度 (測定値)	回収率
1	51.4	103%
2	51.5	103%
3	48.6	97%

添加回収試験用試料

添加回収試験用試料に
オルニチンを添加した試料

図5　添加回収試験用試料および添加回収試験試料に添加した各MRMクロマトグラム(試料1)および回収率

また、試験用試料の連続測定前・中間、後にそれぞれ検量線作成用試料の中間濃度 100 ng/mLのQC測定を行った結果を表4に示しました。正確さ>±10%と良好な結果が得られました。

表4　QC測定結果（STD 100 ng/mL）

	測定濃度	正確さ(%)
試験用試料測定前	102.63	103%
試験用試料測定中間	106.34	106%
試験用試料測定後	107.63	108%

■まとめ

今回、日本農林規格JAS0016に従い、適した分析条件にてLCMS-8060NXを使用し分析した結果、ぶなしめじ中のオルニチンを高感度に、精度良く分析可能であることが確認できました。

また、オルニチンを多く含有する食品として、しじみがよく知られていますが、ぶなしめじは、しじみより更に多く含有する傾向にあることが分かりました。

今後、ぶなしめじがより一層注目され、測定機会が多く見込まれる際には、試料の誘導体化を必要とせず簡便に分析が可能なタンデム質量分析計による測定がお薦めです。

＜参考文献＞
農林水産省告示：きのこ (ぶなしめじ) 中のオルニチンの定量―高速液体クロマトグラフ法の日本農林規格を制定する件 (令和3年3月31日 農林水産省 告示第445号)

【FAMIC】JAS0016 きのこ（ぶなしめじ）中のオルニチンの定量法の解説

＜YouTube＞
https://www.youtube.com/watch?v=yw0tbbABBp0
(2021年 9月30日)

LCMS、Nexera および Shim-pack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。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00175-JP　初版発行：2021年 10月

島津コールセンター 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm
会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、https://solutions.shimadzu.co.jp/ よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2021