

Application News

No. C156

LC/MS

カラムスイッチングシステムを用いた発酵飲料中のキラルアミノ酸分析

タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸は、グリシンを除いて D/L の光学異性体が存在します。D-アミノ酸の含量は L-アミノ酸に比べると極めて低いものですが、近年、野菜や果物など様々な食物に含まれることが明らかになりました。特に発酵食品には数種類の D-アミノ酸が存在することが知られています。

食物に含まれる D-アミノ酸には様々な効果があります。D-alanine や D-leucine、D-phenylalanine はそれぞれの L-アミノ酸に比べ甘みが強いと知られています。そのため、D-アミノ酸の含量は発酵食品の味に影響を与えると考えられており、発酵食品中の D-アミノ酸の高感度・高選択的な分析法が注目されています。

本アプリケーションニュースでは、高圧流路切換バルブ (FCV) で 2 種のキラルカラムを交互に使用するカラムスイッチングシステム (アプリケーションニュース C149) を用いた発酵飲料の分析例をご紹介します。

Y. Uno, T.Hattori

■ サンプルの前処理

3 種の黒酢飲料と 2 種のヨーグルト飲料を使用しました。各試料は、水・メタノール・クロロホルムによる液-液抽出で前処理をしました⁽¹⁾。プロトコルを図 1 に示します。

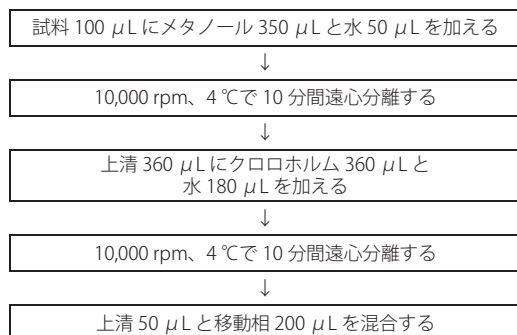


図 1 前処理プロトコル

表 1 測定条件

Column	: CROWNPAK CR-I(+)/CR-I(-) (3 mm × 150 mm, 5 µm)
Mobile phase	: acetonitrile/ethanol/water/TFA = 80/15/5/0.5
Flow rate	: 0.6 mL/min.
Injection volume	: 1 µL
Oven temperature	: 20 °C
Ionization mode	: ESI (Positive)
Probe voltage	: +4.0 kV
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min.
Drying gas flow	: 15.0 L/min.
Heating gas flow	: 5.0 L/min.
Interface temperature	: 250 °C
DL temperature	: 250 °C
Block heater temperature	: 300 °C

■ 黒酢飲料の分析結果

3 種の黒酢飲料全てに D-アミノ酸が含まれていることを確認しました (表 2)。D/L 存在比を確認したところ、黒酢飲料 B と黒酢飲料 C には、D-Ala が比較的多く含まれていることがわかりました。

表 2 黒酢飲料に含まれるアミノ酸の D/L 比

	黒酢飲料 A		黒酢飲料 B		黒酢飲料 C	
	Area	ratio of D/L	Area	ratio of D/L	Area	ratio of D/L
D-Ala	7127	3.8 %	54094	20.5 %	26505	15.5 %
L-Ala	187083		263547		171483	
D-Arg	23703	0.6 %	81626	2.4 %	106896	1.7 %
L-Arg	3945110		3353883		6214029	
D-Asn	7047	1.3 %	11213	3.4 %	13135	3.0 %
L-Asn	547867		333152		433012	
D-Asp	6934	1.5 %	7086	2.3 %	8248	2.2 %
L-Asp	476730		302901		370152	
D-Cys	(N.D.)	-	(N.D.)	-	(N.D.)	-
L-Cys	(N.D.)		(N.D.)		(N.D.)	
D-Gln	4153	56.1 %	5013	128.1 %	5738	17.3 %
L-Gln	7399		3912		33155	
D-Glu	11658	0.7 %	36502	2.2 %	7575	1.1 %
L-Glu	1635202		1675657		713130	
Gly	2375		6382		3163	
D-His	(N.D.)	-	(N.D.)	-	(N.D.)	-
L-His	351973		410895		232228	
D-Ile	1262	0.3 %	(N.D.)	-	1861	0.6 %
L-Ile	392041		580580		330869	
D-allo-Ile	1816	50.3 %	(N.D.)	-	2519	136.9 %
L-allo-Ile	3612		4357		1840	
D-Leu	3255	0.5 %	4698	0.5 %	4198	0.9 %
L-Leu	691108		1031536		493487	
D-Lys	13921	1.4 %	4446	0.4 %	28009	5.1 %
L-Lys	965688		1220610		548517	
D-Met	(N.D.)	-	(N.D.)	-	(N.D.)	-
L-Met	22647		48753		13151	
D-Phe	2738	0.4 %	3587	0.7 %	3634	0.9 %
L-Phe	746758		549410		419561	
DL-Pro	301069		683984		549718	
D-Ser	10568	9.3 %	8036	7.5 %	4653	8.5 %
L-Ser	113543		106729		54472	
D-Thr	2646	1.7 %	4374	2.3 %	2036	1.2 %
L-Thr	159723		193429		170581	
D-allo-Thr	1973	91.6 %	3538	120.7 %	1297	66.6 %
L-allo-Thr	2153		2932		1946	
D-Trp	2098	23.2 %	2195	39.1 %	4159	39.6 %
L-Trp	9045		5609		10506	
D-Tyr	7314	1.7 %	2495	0.8 %	4026	1.4 %
L-Tyr	437963		314522		297401	
D-Val	3046	0.5 %	3186	0.4 %	3613	0.9 %
L-Val	573054		870777		387972	

■ ヨーグルト飲料の分析結果

2種のヨーグルト飲料どちらにも D-アミノ酸が含まれていることを確認しました(表3)。D/L 存在比を確認したところ、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Lys、Ser で D-アミノ酸が比較的多く含まれることが分かりました。特に D-Glu は、どちらのヨーグルト飲料にも L-Glu の 40 倍以上含まれていました。

表3 ヨーグルト飲料に含まれるアミノ酸の D/L 比

	ヨーグルト D		ヨーグルト E	
	Area	ratio of D/L	Area	ratio of D/L
D-Ala	140959	164.0 %	37900	40.2 %
L-Ala	85940		94190	
D-Arg	81779	6.9 %	95602	36.5 %
L-Arg	1192614		262060	
D-Asn	60836	43.2 %	3209	16.5 %
L-Asn	140872		19416	
D-Asp	47149	38.1 %	2441	15.3 %
L-Asp	123860		16003	
D-Cys	(N.D.)	-	(N.D.)	-
L-Cys	(N.D.)		(N.D.)	
D-Gln	4743	0.6 %	5157	19.8 %
L-Gln	856603		26021	
D-Glu	412572	4091.1 %	163715	5069.6 %
L-Glu	10085		3229	
Gly	957	-	1106	-
D-His	(N.D.)		(N.D.)	
L-His	839834	-	175326	5.2 %
D-Ile	1428		1366	
L-Ile	176626	0.8 %	130832	1.0 %
D-allo-Ile	2225		1247	
L-allo-Ile	3744	59.4 %	3172	39.3 %
D-Leu	4042		(N.D.)	
L-Leu	403567	1.0 %	132923	-
D-Lys	1151264		24797	
L-Lys	1565451	73.5 %	698677	3.5 %
D-Met	463		(N.D.)	
L-Met	54490	0.9 %	(N.D.)	-
D-Phe	1600		1799	
L-Phe	313615	0.5 %	117732	1.5 %
DL-Pro	2094819		888155	
D-Ser	14619	14.4 %	8332	29.3 %
L-Ser	101651		28395	
D-Thr	1711	1.5 %	3314	4.6 %
L-Thr	112074		71653	
D-allo-Thr	1973	42.5 %	1020	23.7 %
L-allo-Thr	4647		4294	
D-Trp	3039	1.9 %	1879	13.3 %
L-Trp	155899		14086	
D-Tyr	4882	2.1 %	5876	107.4 %
L-Tyr	230926		5470	
D-Val	1241	0.4 %	1277	0.9 %
L-Val	285792		148323	

■ 発酵飲料の D/L アミノ酸含量の比較

D 体が比較的多く含まれているアミノ酸について、黒酢飲料とヨーグルト飲料で含量を比較しました(図2)。黒酢飲料に比べて、ヨーグルト飲料の方が様々な D-アミノ酸を含んでいることが示されました。

D-Ala と D-Ser は黒酢飲料とヨーグルト飲料の両方で検出されましたが、D-Ala はヨーグルト飲料により多く含まれていました。

ヨーグルト飲料の L-Glu は黒酢飲料に比べると非常に少ないことが分かりました。また、ヨーグルト飲料の D-Glu 含量は黒酢飲料の L-Glu 含量と比べても、比較的多いものであると示されました。

ヨーグルト D には、様々な D-アミノ酸が比較的多量に含まれていました。特に D-Ala と D-Lys は黒酢飲料と比べても、多量に含まれていました。

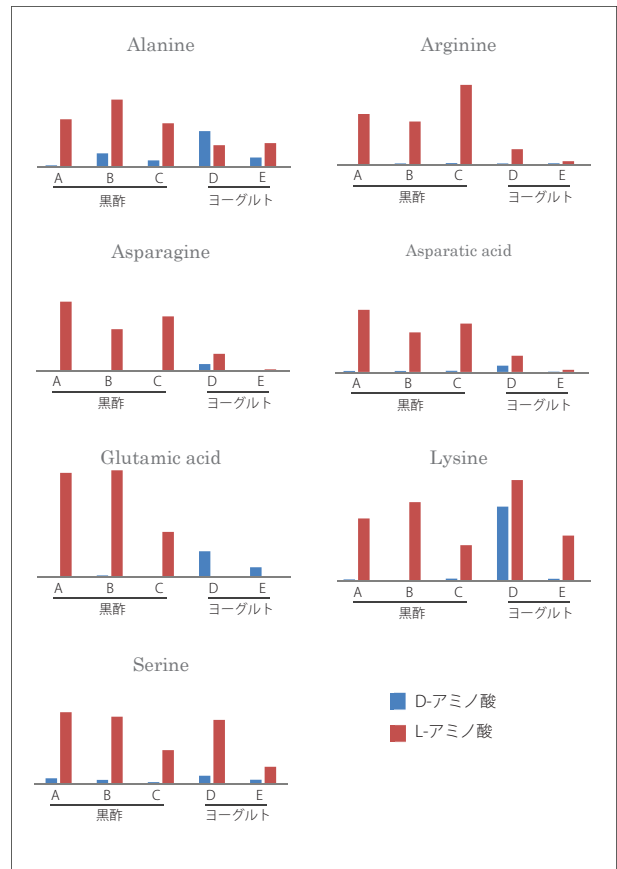


図2 黒酢飲料とヨーグルト飲料の D/L アミノ酸の比較

以上の分析結果から、カラムスイッチングを用いたキラルアミノ酸分析法は、実試料の分析においても有用であることが示されました。

参考文献

[1] Nakano, Y., Konya, Y., Taniguchi, M., Fukusaki, E., Journal of Bioscience and Bioengineering, 123, 134-138 (2016)

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

初版発行：2017年4月

島津コールセンター 0120-131691
(075) 813-1691

※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。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。