

乳児および成人用調製粉乳における アミノ酸の非誘導体化LC/MS/MS定量法

Zhe Sun¹, Wantung Liw¹, Nur Sadrina Binte Mohamed Shah², Jie Xing¹, Zhaoqi Zhan¹
1 Shimadzu (Asia Pacific) Pte Ltd, Singapore 2 Student from Nanyang Technological University, Singapore

ユーザーベネフィット

- ◆ LC/MS/MSを用いることで、アミノ酸の煩雑な誘導体化操作が不要です。
- ◆ 1分析21分サイクルで、調製粉乳に含まれる18成分のアミノ酸の一斉分析が可能です。

■はじめに

乳児および成人用調製粉乳中のたんぱく質構成L- α -アミノ酸およびタウリンの定量分析は、製造業者および栄養研究所で日常的に行われています。良質のたんぱく源である粉乳には、必須アミノ酸が含まれています。タウリンは一般的に乳児用粉ミルクに含まれ、有害物質への曝露からヒトを保護することができます。一般に、アミノ酸の定量分析は、煩雑な操作を伴うプレカラムあるいはポストカラム誘導体化を行うHPLC-RF法によって行われます。通常、AOACの要求事項に記載されているすべてのアミノ酸を定量するには、3種類の加水分解法が必要です^{1), 2)}。近年、簡便で迅速な非誘導体化LC/MS/MS法が報告され、種々の食品や生体試料中の遊離アミノ酸³⁾やたんぱく加水分解物の定量に応用されています。

本研究では、認証標準物質 (SRM) であるNIST 1849a 乳児/成人用調製粉乳を用いて、たんぱく質構成アミノ酸とタウリンを定量するための非誘導体化LC/MS/MS法を検証しました。

■分析条件および前処理

20成分のアミノ酸とタウリン (Tau) の標準原液は、市販アミノ酸標準物質から調製しました。分析法バリデーションには、NIST 1849a 乳児/成人用調製粉乳を使用しました。また、市販品として6種類の幼児および成人用調製粉乳を使用しました。前処理は、以下に示す異なる加水分解法を行いました。

- (1) 酸加水分解法: 0.5 mLの37%塩酸と0.5 mLのプロピオン酸を50 mgの試料に加え、160 °Cで1時間加熱後、窒素ガスで乾燥しました。
- (2) アルカリ加水分解法: 50 mgの試料に4N 水酸化ナトリウム溶液 1 mLを加え、195 °Cで1時間加熱しました。次いで、1N 塩酸を用いてpH 4に調整し、生成した塩を遠心分離によって除去しました。
- (3) 過酸化水素加水分解法: 調製した過酸化水素(30%過酸化水素水=9:1) 2 mLを50 mgの試料に加え、水浴中で50 °Cにて1時間加熱しました。次いで、上記と同様に酸加水分解法により試料を加水分解しました。

LC分析条件とMS分析条件を表1と表2に示します。トリプル四重極質量分析計はLCMS-8045を、分析カラムは、アミノ酸専用カラムを採用し、グラジエント溶離法で分離しました。

表1 LC分析条件

Column	Intrada Amino Acid Column (100 mm × 3.0 mm I.D., 3 μm)
Flow rate	0.6 mL/min
Mobile phase	A) Acetonitrile/ tetrahydrofuran/ 25 mmol/L ammonium formate/ formic acid=9:75:16:0.3 B) Acetonitrile/ 100 mmol/L ammonium formate=80:20
Time Program	0%B (0-3 min)→17%B (9 min) →100%B (16-18 min)→0%B (18.10-21 min)
Column temp.	35 °C
Injection volume	3 μL

表2 MS分析条件

Interface & Temp.	Heated ESI, 300 °C
Mode	MRM (positive and negative)
Block Temp.	400 °C
DL Temp.	250 °C
CID Gas	Ar (230 kPa)
Nebulizing Gas	N ₂ , 2 L/min
Flow	N ₂ , 2 L/min
Drying gas flow	N ₂ , 10 L/min
Heating gas flow	Zero Air, 10 L/min

■LC/MS/MSによる20成分のアミノ酸およびタウリンの定量分析

対象成分は、20成分のたんぱく質構成アミノ酸およびタウリンです。混合標準溶液を用いて20成分のアミノ酸およびタウリンの定量分析のMRM測定条件を確立しました。6点検量線 (0.1、0.5、1、5、20および50 μmol/L、0.1N 塩酸で調製) を作成し、SRMと実試料の定量に使用しました。得られた20成分のアミノ酸およびタウリンの標準物質のMRMクロマトグラムを図1 (上段) に示します。また、代表して6成分の検量線を図2に示します。

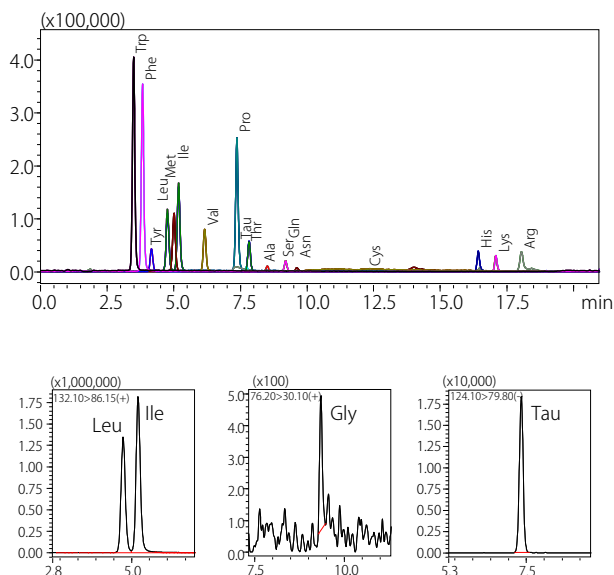


図1 20成分のアミノ酸およびタウリン混合標準溶液（各20 mmol/L, 0.1N 塩酸で調製）のMRMクロマトグラム（上段）
代表的な化合物のMRMクロマトグラム（下段）

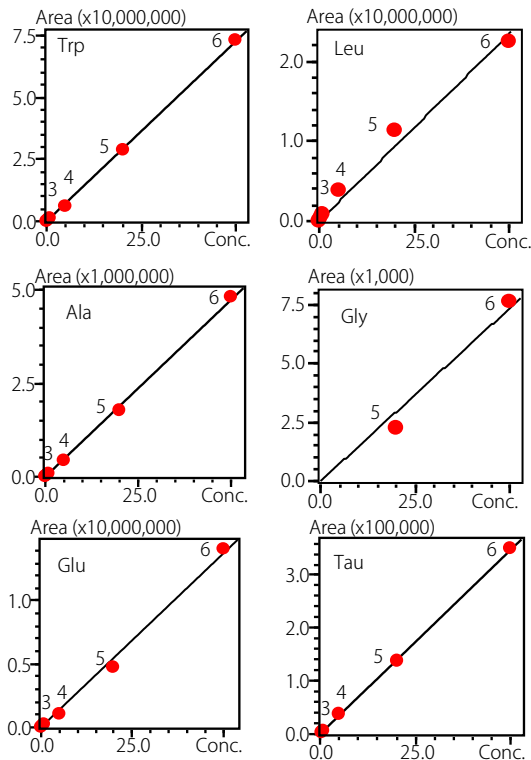


図2 検量線（0.1-50 μmol/L, 0.1N 塩酸で調製）

■ SRMを用いた前処理（加水分解法）の評価

前処理（加水分解法）とLC/MS/MS分析の評価には、認証標準物質（SRM）NIST 1849a 乳児/成人用調製粉乳を使用しました。調製粉乳中のたんぱく質を160 °Cで酸加水分解法（1）により加水分解しました。加水分解の反応時間を検討した結果、1時間の条件で最も多くのアミノ酸が生成することが分かりました（図3）。トリプトファンは、酸加水分解条件下では分解するため、アルカリ加水分解法（2）を採用しました。一方、システイン/シスチンでは、過塩素酸分解法（3）を行いました。アルカリ加水分解法では、試料を異なる温度条件で30分間、4N 水酸化ナトリウム溶液を用いて加水分解しました。図3より、トリプトファンおよびほとんどのアミノ酸に対して、195 °Cでの加水分解で最良な結果をもたらすことが示されました。ただし、プロリン、アスパラギン酸およびタウリンでは、180 °Cでの条件の方が良好な結果が得られました。

したがって、アルカリ加水分解は、195 °Cで1時間の条件を採用しました。過塩素酸分解法において、システインおよびシスチンはシステイン酸に変換後、検量線を用いて定量しました。加水分解したSRMの分析結果を表2にまとめ、NISTの参照値と比較しました。18成分のうち6成分の定量結果は参照値（Ile、Val、Glu、Cys、HisおよびTau）と一致しました。また、11成分は参照値からわずかに外れました（低回収率：8成分、高回収率：3成分）。しかし、Alaの定量結果は参照値をはるかに下回っていました（回収率：26.4%）。

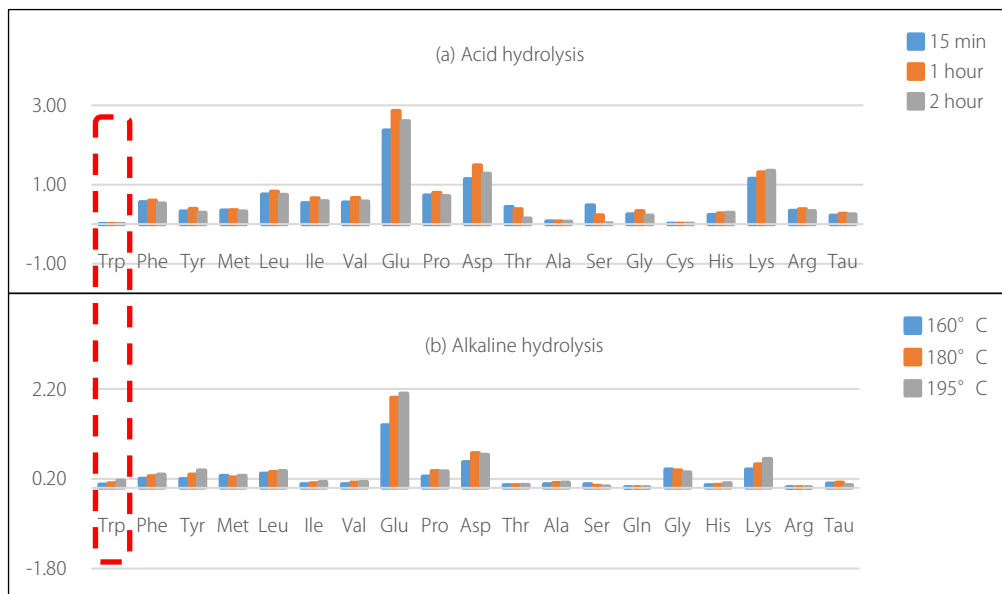


図3 異なる加水分解条件下でのSRM中の全アミノ酸のプロファイル（単位: g/100 g）
(a) 異なる時間での酸加水分解（160 °C）
(b) 異なる温度でのアルカリ加水分解（0.5時間）

表2 SRM (NIST 1849a) 中のアミノ酸及びタウリン (g/100 g) の定量結果

Amino Acid	MRM Transition	RT (min)	Measured Cont. (g/100g)	NIST 1849a Value	Extended Uncertainty	Recovery (%)	Matrix Factor (%) ^[3]
Tryptophan ^[1]	205.1>188.1	3.49	0.161	0.184	0.01	87.5	- ^[3]
Phenylalanine	166.1>120.1	3.83	0.711	0.58	0.021	122.6	80.8
Tyrosine	182.1>136.0	4.16	0.435	0.51	0.043	85.2	82.6
Leucine	132.1>86.2	4.76	0.947	1.261	0.05	75.1	86.9
Isoleucine	132.2>86.2	5.18	0.666	0.66	0.071	100.9	85.4
Valine	118.1>72.1	6.16	0.654	0.76	0.11	86.1	90.5
Glutamic acid	148.1>84.1	7.21	2.832	2.59	0.27	109.3	104.2
Proline	116.1>70.1	7.37	0.842	1.195	0.086	70.5	90.4
Aspartic acid	134.2>74.1	8.24	1.228	1.07	0.057	114.8	118.1
Threonine	120.1>74.0	7.73	0.524	0.64	0.022	81.9	104.5
Alanine ^[1]	90.1>44.1	8.51	0.120	0.455	0.021	26.4	- ^[3]
Serine	106.1>60.2	9.00	0.526	0.72	0.03	73.1	112.3
Glycine	76.2>30.1	9.37	0.180	0.241	0.019	74.7	133.5
Cystine ^[2]	241.0>152.0	12.24	0.125	0.1286	0.0071	97.2	-
Histidine	156.1>110.1	16.44	0.305	0.315	0.036	96.9	123.6
Lysine	147.0>84.1	17.10	1.392	1.01	0.071	137.9	115.0
Arginine	175.1>70.1	18.07	0.366	0.4	0.029	91.4	114.5
Taurine ^[1]	(-)124.1>80.0	7.36	0.040	0.0366	0.0018	109.3	- ^[3]

Note:

[1] Trp, Ala, Tauはアルカリ加水分解法における結果

[2] 過酸化分解法によるシステイン酸のデータからシスチン/システインの結果を算出

[3] マトリクスファクターは酸加水分解試料についてのみ算出

■ 乳児および成人用調製粉乳中のアミノ酸の定量

最適化した前処理法とLC/MS/MS条件を実際の乳児および成人用調製粉乳に適用しました。6種類の粉乳の結果を表3、図4および図5に示します。

成人用調製粉乳中の総アミノ酸量は、タウリンを除いて乳児用調製粉乳中の2倍以上であることがわかりました。さらに、乳児用および成人用調製粉乳の両者において、リジン、アスパラギン酸およびグルタミン酸は、他のアミノ酸に比べ、多く含まれていました。

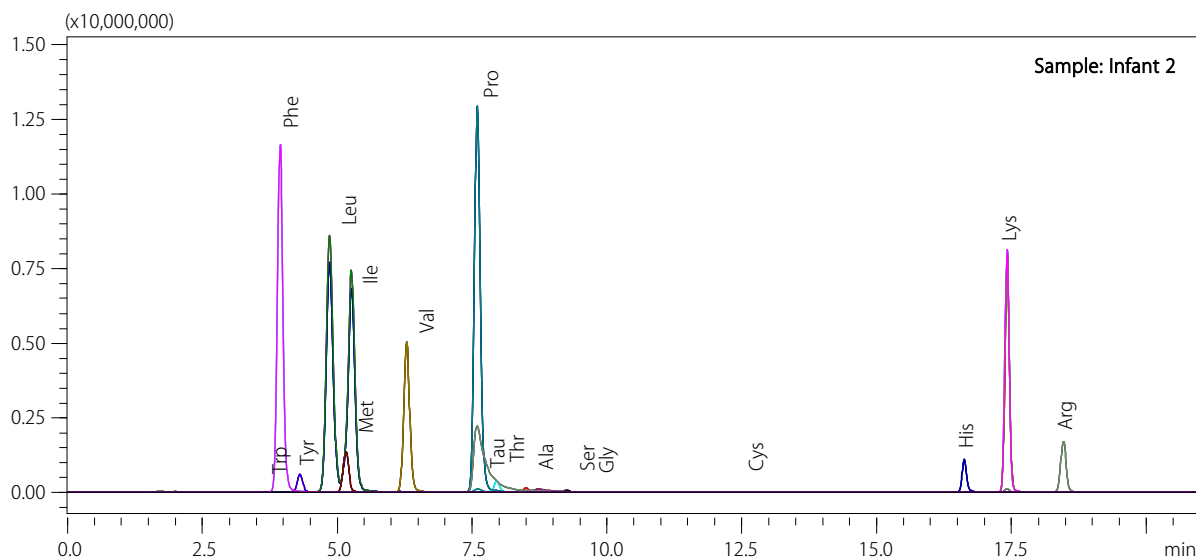


図4 粉乳試料中の18成分のアミノ酸のMRMクロマトグラム (Infant 2)

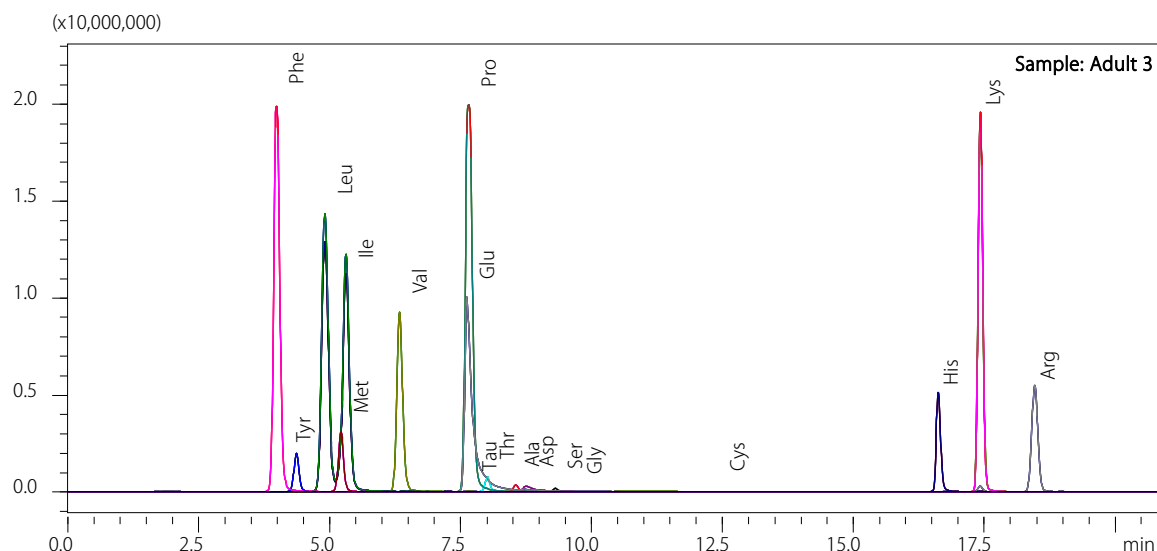


図5 粉乳試料中の18成分のアミノ酸のMRMクロマトグラム (Adult 3)

表3 LC/MS/MS条件による小児用および成人用調製粉乳中の17成分のアミノ酸とタウリンの定量結果 (g/100 g)

Milk Powder	Infant 1	Infant 2	Ave. (Infant)	Adult 1	Adult 2	Adult 3	Adult 4	Ave. (Adult)
Tryptophan ^[1]	0.09	0.16	0.12	0.22	0.23	0.20	0.19	0.21
Phenylalanine	0.40	0.40	0.40	0.73	0.70	0.76	0.83	0.76
Tyrosine	0.17	0.16	0.16	0.44	0.36	0.50	0.57	0.47
Leucine	0.69	0.67	0.68	1.02	1.06	1.13	1.21	1.10
Isoleucine	0.58	0.56	0.57	0.82	0.57	0.89	0.92	0.80
Valine	0.48	0.46	0.47	0.77	0.79	0.86	1.07	0.87
Glutamic acid	1.39	1.52	1.46	3.98	3.64	4.36	5.61	4.40
Proline	0.57	0.58	0.58	0.96	1.03	1.06	1.16	1.05
Aspartic acid	0.70	0.70	0.70	1.37	1.29	1.43	1.66	1.43
Threonine	0.23	0.21	0.22	0.33	0.39	0.40	0.59	0.43
Alanine ^[1]	0.11	0.10	0.11	0.21	0.21	0.18	0.17	0.19
Serine	0.09	0.08	0.09	0.19	0.25	0.24	0.30	0.24
Glycine	0.12	0.12	0.12	0.30	0.65	0.34	0.37	0.42
Cystine ^[2]	0.20	0.21	0.21	0.26	0.17	0.29	0.29	0.25
Histidine	0.13	0.14	0.13	0.46	0.44	0.63	0.61	0.53
Lysine	0.75	0.76	0.76	1.66	1.78	2.00	1.97	1.85
Arginine	0.16	0.20	0.18	0.55	0.66	0.72	0.73	0.67
Taurine ^[1]	0.048	0.037	0.04	0.0010	0.010	0.050	0.030	0.02
Total	6.91	7.07	6.99	14.27	14.21	16.04	18.28	15.70

Note:

[1] Trp, Ala, Tauはアルカリ加水分解法における結果

[2] 過塩素酸酸化分解法によるシステイン酸のデータからシスチン/システインの結果を算出

■まとめ

NIST 1849 a小児/成人用調製粉乳を用いて、試料の加水分解および18成分のアミノ酸の非誘導体化LC/MS/MS分析のメソッドを検証しました。AOACの要求事項に記載されているすべてのアミノ酸を定量するには、3種類の加水分解法が必要でした。18成分のアミノ酸の測定結果は、NISTの参照値と近い値が得られました（回収率が26.4%であるアラニンを除く）。アラニンの回収率についてはさらなる研究が必要ですが、本法により、誘導体化を伴うHPLC-RF法より短時間で簡便にアミノ酸を一斉分析できます。

【参考文献】

- Standard Method Performance Requirements for Determination of Amino Acids in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula, AOAC SMPR 2014.013
- Spindler, M., Stadler, R. and Tanner, H., J. Agric. Food Chem. 1984, 32, 1366-1371
- Sun Z., Xing J., Khoo P.Y. and Zhan Z, ASMS 2016, TP 740

LCMS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。