



Agilent 6120 シングル四重極 LC/MS による 味噌中アミノ酸、有機酸の一斉分析



＜要旨＞ Agilent 6120 シングル四重極型 LC/MS を用いて、非誘導体アミノ酸 23 種類と有機酸 14 種類を一斉に分析可能な手法を開発しました。本手法は食品中のアミノ酸と有機酸類を、一般的な逆相条件と同じ移動相条件を用いて簡便且つ迅速に定量分析することが可能です。

Key Words: LC/MS、SIM、アミノ酸、有機酸、食品、機能性成分、親水性成分

* * * * *

1. はじめに

特定保健用食品(トクホ)、栄養機能食品に続いて第三の保健機能食品として、2015年4月に機能性表示食品制度が施行されました。機能性表示食品は2016年3月現在で241件の届出書が受理されており、今後も増え続けることが予想されます。事業者は有効成分の分析データ等の科学的根拠を示す必要があるため、機能性成分の分析需要は高まっています。効率的な商品開発のために、できるだけ多くの機能性成分を簡便且つ迅速に分析する手法が必要とされています。

そこで、本稿では食品の機能性に関わる成分として、アミノ酸と有機酸類について簡便且つ迅速に一斉分析できる条件を Agilent 6120 シングル四重極 LC/MS を用いて検討しました。また、開発した分析手法を味噌へ適用したので紹介します。

2. 実験方法

アミノ酸はアミノ酸標準試料(P/N: 5061-3330)とアミノ酸補助キット(P/N: 5062-2478)を使用しました。粉末試料は0.1%ギ酸水/アセトニトリル=50/50(v/v, %)で溶解しました。有機酸は各標準試料を超純水で溶解しました。各標準品溶液を超純水で希釈し、アミノ酸23種類および有機酸14種類の混合溶液を LC/MS に供しました。Table 1 に SIM モニタリングイオンを示しました。アミノ酸は ESI-Positive でプロトン付加分子([M+H]⁺)、有機酸は ESI-Negative でプロトン脱離分子([M-H]⁻)をそれぞれ

モニタリングしました。

味噌サンプルは30mgを2mlマイクロチューブに秤量後、1mlの超純水を加えて30秒間ボルテックスで攪拌した後に超音波で30秒間抽出しました。そして、分画分子量3000の限外ろ過フィルターによりろ過を行い、超純水で10倍に希釈したものを LC/MS に供しました。

機器条件

ソフトウェア: OpenLAB ChemStation Edition

Liquid Chromatography

装置: Agilent 1260 Binary Pump System

カラム: Discovery HS-F5 (2.1 x 250mm, 5 μm, Sigma-Aldrich)

移動相: A: 0.1% ギ酸水溶液

B: アセトニトリル

流速: 0.25 mL/min

カラム温度: 40 °C

注入量: 3 μl

グラジエント: 時間(分) %B

0 0

2 0

5 25

11 35

15 95

ポストタイム: 10分



Mass Spectrometry

装置: Agilent 6120 シングル四重極 LC/M システム
イオン源 : Electro Spray Ionization
極性 : ポジティブ/ネガティブモード
乾燥ガス : N₂ (350°C at 10 L/min)
ネブライザーガス : N₂ (50 psi)
キャピラリー電圧 : 2500 V
フラグメンター電圧 : 80V

Table 1 SIM モニタリングイオン

アミノ酸	m/z (ポジティブ)
Gly	76
Ala	90
β-Ala	90
GABA	104
Ser	106
Pro	116
Val	118
Thr	120
Pyr-Glu	130
Ile	132
Leu	132
Asn	133
Asp	134
Gln	147
Lys	147
Glu	148
Met	150
His	156
Phe	166
Arg	175
Tyr	182
Trp	205
Cys-Cys	241

有機酸	m/z (ネガティブ)
グリコール酸	75
ピルビン酸	87
乳酸	89
フマル酸	115
コハク酸	117
リンゴ酸	133
2-オキシグルタル酸	145
酒石酸	149
シキミ酸	173
クエン酸	191

キナ酸	191
グルクロン酸	193
ガラツクロン酸	193
グルコン酸	195

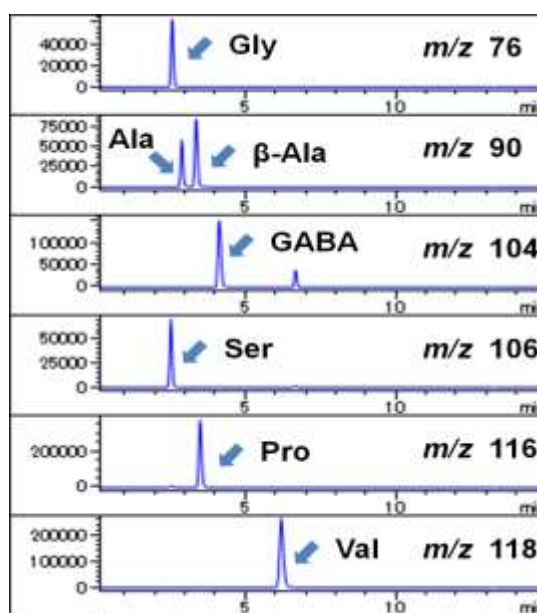
3. 結果及び考察

Fig. 1に標準試料混合溶液 5 μg/ml のアミノ酸 23 種類の SIM クロマトグラムを示しました。アミノ酸は ESI-Negative でも検出可能ですが、ESI-Positive でより感度良く検出することができました。また、Fig. 2に標準試料混合溶液 5 μg/ml の有機酸 14 種類の SIM クロマトグラムを示しました。グルクロン酸とガラツクロン酸は保持時間とモニタリングイオンが同じため、分離できませんでしたが、他の全ての成分はそれぞれ保持時間あるいはモニタリングイオンの違いによって一斉に検出することが可能でした。Table 2 に各成分の検量線の直線範囲と相関係数をそれぞれ示しました。数十～数千 ng/ml の範囲で相関係数 0.995 以上の良好な直線性を示しました。

Fig. 3 及び 4 に味噌中アミノ酸と有機酸類のクロマトグラムをそれぞれ示しました。味噌中からアミノ酸 20 種類、有機酸 11 種類を検出することが可能でした。クエン酸は異性体であるイソクエン酸と供溶出したため、改善の余地があります。

4. まとめ

アミノ酸と有機酸の一斉分析条件を検討しました。食品中のアミノ酸 23 種類と有機酸 14 種類を簡便且つ迅速に分析可能な分析手法を開発しました。



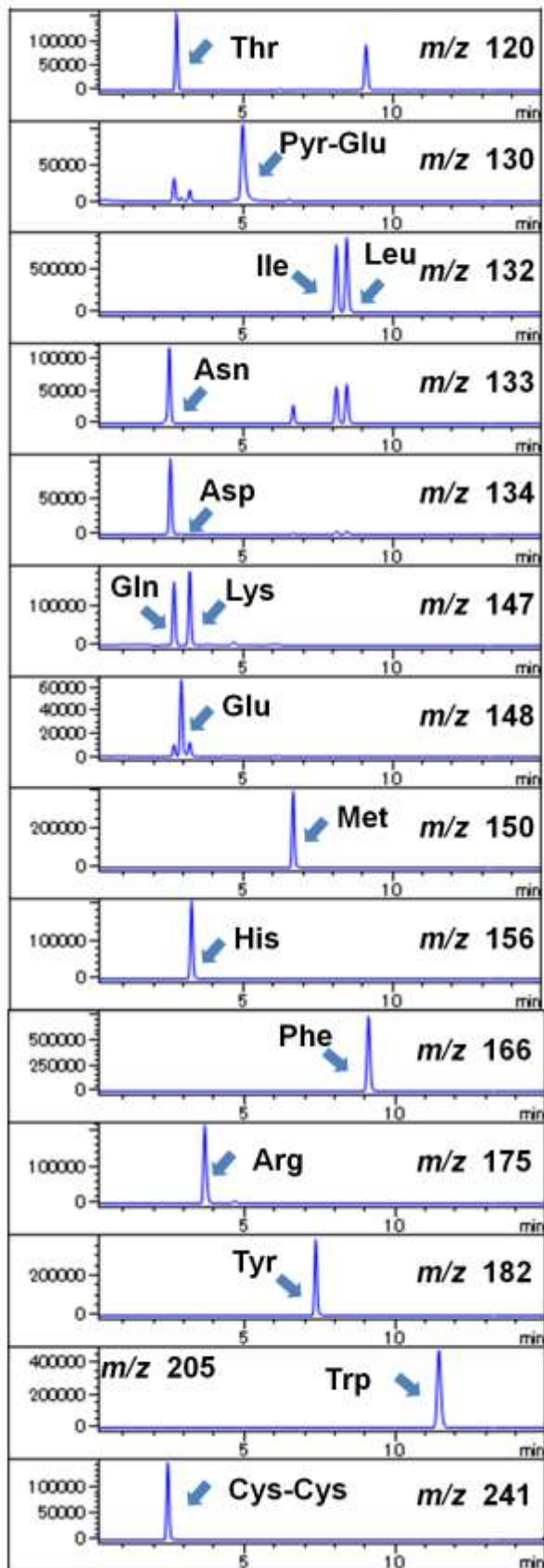


Fig.1 アミノ酸標準試料 (23種) のSIMクロマトグラム 濃度: 5 μ g/ml、ESI-Positive

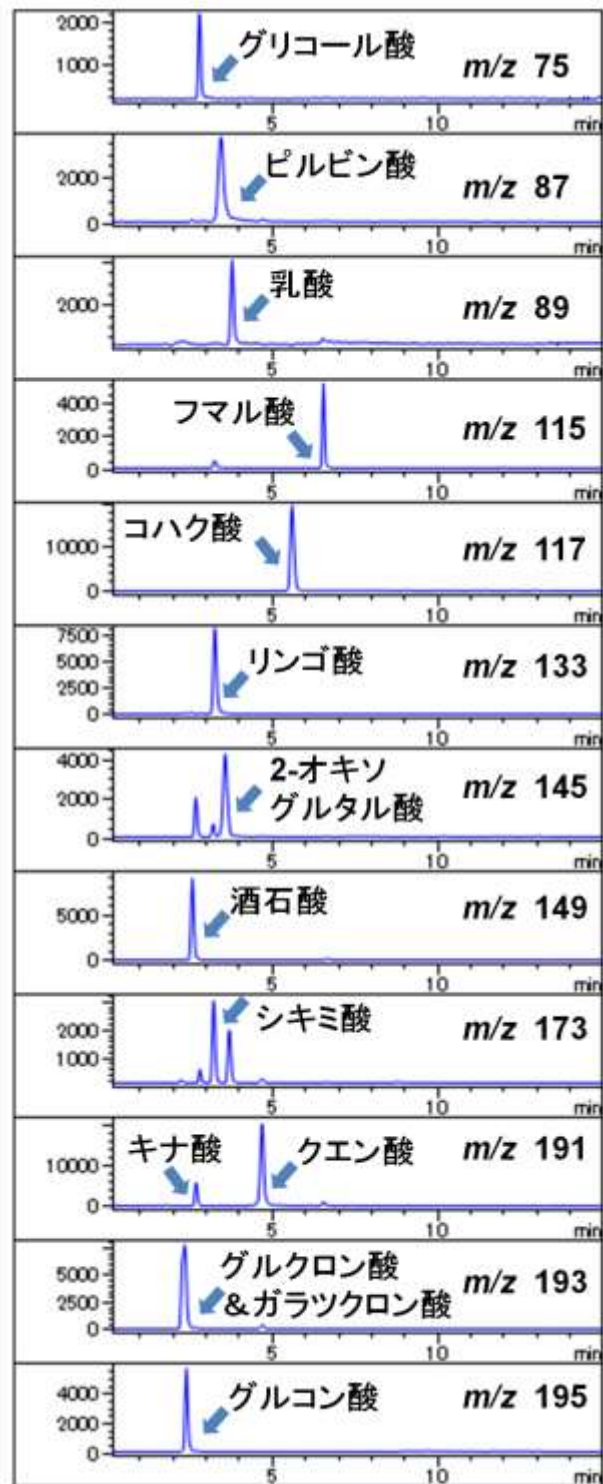
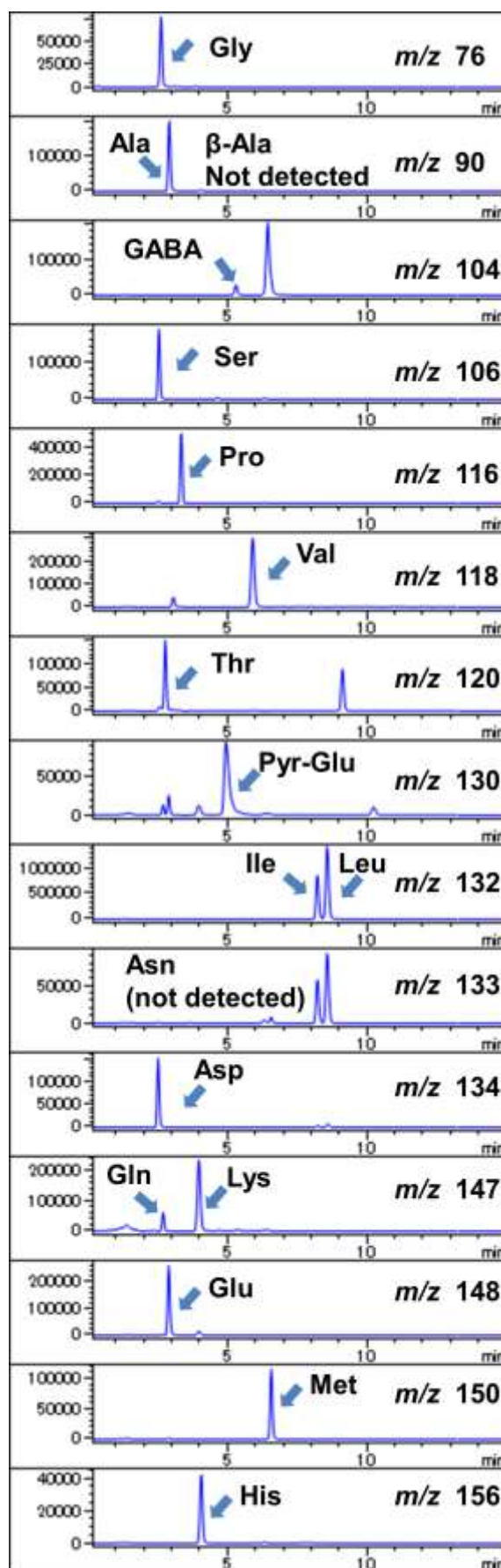


Fig.2 有機酸標準試料 (14種) のSIMクロマトグラム 濃度: 5 μ g/ml、ESI-Negative



Table 2 各成分の直線範囲と相関係数

成分	直線範囲 / ppb	相関係数
Gly	12-2600	0.998
Ala	15-3000	0.999
β -Ala	15-1500	0.999
GABA	5-2500	0.999
Ser	18-1800	0.998
Pro	4-3800	0.999
Val	20-2000	0.999
Thr	20-4000	0.999
Pyr-Glu	25-5000	0.998
Ile	4-2200	0.999
Leu	4-2200	0.999
Asn	25-2500	0.999
Asp	22-4400	0.998
Gln	50-5000	0.997
Lys	60-3000	0.998
Glu	5-5000	0.999
Met	5-2500	0.999
His	5-5000	0.999
Phe	6-2753	0.999
Arg	6-2900	0.999
Tyr	6-6000	0.999
Trp	5-5000	0.999
Cys-Cys	40-4000	0.999
グリコール酸	50-5000	0.989
ピルビン酸	50-5000	0.999
乳酸	50-5000	0.999
フマル酸	50-5000	0.998
コハク酸	50-5000	0.997
リンゴ酸	50-5000	0.997
2-オキシグルタル酸	50-5000	0.999
酒石酸	50-5000	0.999
シキミ酸	50-5000	0.999
クエン酸	50-5000	0.999
キナ酸	50-5000	0.995
グルクロン酸	50-5000	0.995
ガラツクロン酸	50-5000	0.995
グルコン酸	50-5000	0.999

Fig. 3 味噌中アミノ酸のSIMクロマトグラム
味噌 30 μ g オンカラム、ESI-Positive

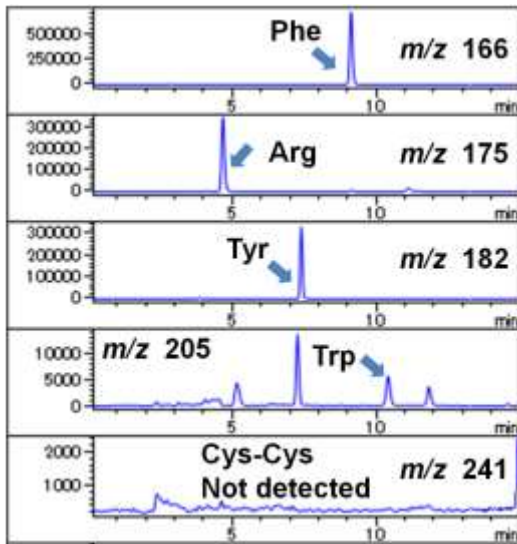


Fig. 3 味噌中アミノ酸のSIMクロマトグラム
味噌 30 μ g オンカラム、ESI-Positive

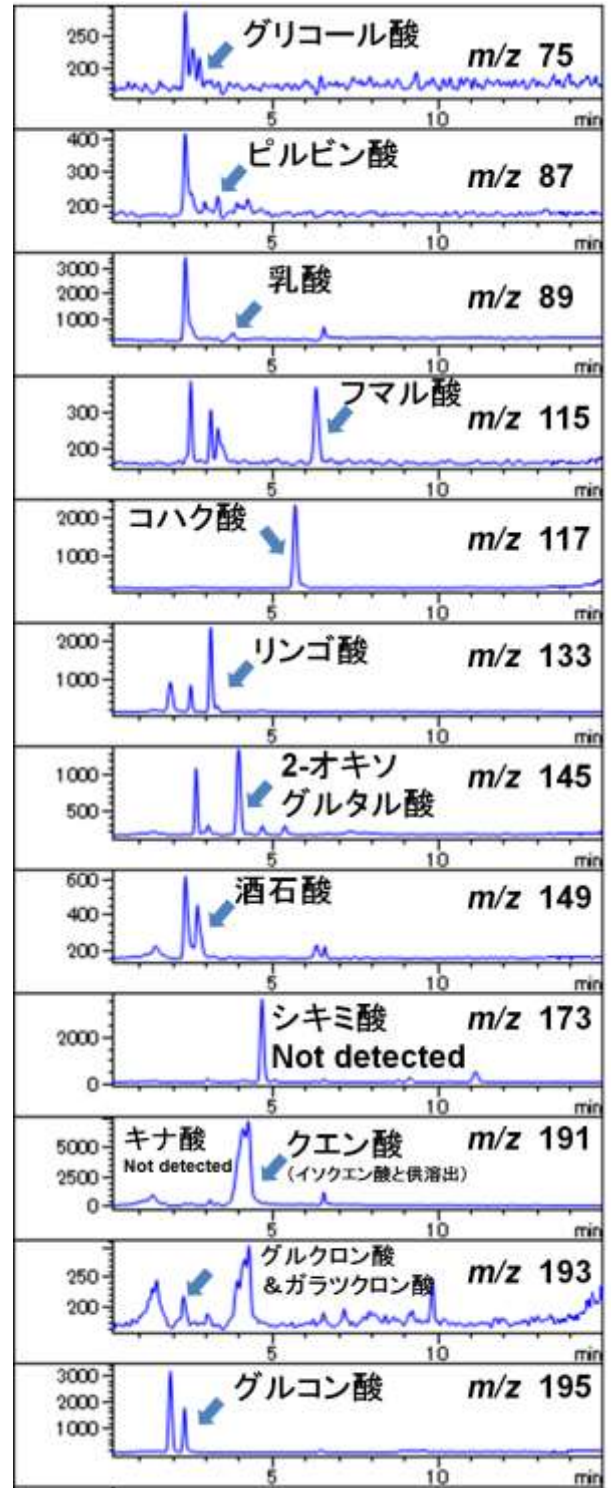


Fig. 4 味噌中有機酸のSIMクロマトグラム
味噌 30 μ g オンカラム、ESI-Negative

【LC-MS-201607YM-002】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp