

Title	LC-TOFMSを用いた非誘導体化D-アミノ酸の高速一斉分析法の開発
Author(s)	紺屋,豊
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/67130
rights	
Note	

# Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

# 論文内容の要旨

氏名 ( 紺屋 豊 )

論文題名

LC-TOFMSを用いた非誘導体化D-アミノ酸の高速一斉分析法の開発

#### 論文内容の要旨

#### 第一章 緒論

グリシンを除くタンパク質構成アミノ酸には鏡像体(L-体とD-体)が存在する.近年,様々な分野でD-アミノ酸が注目・研究されるようになったが,従来の分析法では誘導体化処理が必要であったり,鏡像体分離能やスループットが不十分といった問題があり,簡便かつ堅牢で高速・高分離能を有する分析法の開発が期待されている.そこで,既存の分析法のほぼ最高レベルと照らし合わせてクライテリアを設定し,新規分析法の開発に着手した.

第二章 タンパク質構成アミノ酸鏡像体の標準液を用いたD-アミノ酸分析法の開発(キラル分離のコンセプトの実証)キラルカラム(CROWNPAK CR-I)とLC-TOFMS(TripleTOF 5600)を用い、タンパク質構成アミノ酸鏡像体の混合標準液を分析して、LC条件を検討した。通常用いられる逆相モードでは良好な結果は得られなかったが、HILICモードでの分析を試みたところ、分離が劇的に改善され、最終的に15分の一斉分析が可能となった(グリシンおよび二級アミンであるプロリンを除く)。また、移動相の有機溶媒比率が増したことによりイオン化効率も改善され、ピーク強度は10倍以上に向上した。さらに、分離メカニズムに関して「3点窪み仮説」を提唱し、実験データと照らし合わせたところ、仮説は強く支持された。

#### 第三章 食品中D-アミノ酸定量のための分析条件の最適化(実サンプルへの応用)

食品や生体試料中のD-アミノ酸を分析するために,前処理条件の検討,ならびに移動相の最適化を行った. その結果,分析時間は10分となり,検量線の直線性,ならびに良好な鏡像体ピークの分離能を備えていることが確認できた. その分析法を用いて食品(黒酢,キムチ,ョーグルト)中D-アミノ酸の定量に成功した.

### 第四章 測定対象化合物の拡張

食品や生体試料中には、タンパク質構成アミノ酸以外のアミン類も多数存在するため、それらの同時分析を検討した。その結果、タンパク質構成アミノ酸を含め100種類以上のアミノ酸・アミン類の分析に成功した。各化合物のピーク形状や分離は、従来法に比べ良好であった。

## 第五章 総括と展望

本研究において開発した分析法は当初掲げた3つの目標を大きく上回り、「①非誘導体化法でありながら、②18種類のタンパク質構成アミノ酸についてはアイソクラティック条件で10分以内の一斉分析が可能、③非タンパク質構成アミノ酸やその他のアミン類まで含めると20分以内に100種類以上の一斉分析が可能」であることを実証した。簡便かつ堅牢なアミノ酸・アミン類の分析が求められている幅広い分野において、本法が今後用いられていくことが期待される。

氏	名	( 紺	屋	豊 )		
		(瑠	()	氏	名	
論文審査担当者	主査	教	授	福崎	英一郎	
	副査	教	授	渡邉	肇	
	副査	教	授	村中	俊哉	
	副査	教	授	紀ノ	岡 正博	
	副査	教	授	藤山	和仁	
	副査	教	授	大政	健史	
	副査	教	授	仁平	卓也	
	副査	教	授	永井	健治	
	副査	教	授	老川	典夫	(関西大学化学生命工学部)

### 論文審査の結果の要旨

近年,様々な分野で D-アミノ酸が注目・研究されるようになったが,従来の分析法では誘導体化処理が必要であったり,鏡像体分離能やスループットが不十分といった問題があり,簡便かつ堅牢で高速・高分離能を有する分析法の開発が求められている。本論文ではそうした見地に立って,新規 D-アミノ酸の一斉分析法の開発に着手した.

第一章では緒論として、研究の背景について述べられており、既存の分析法を比較した後、それらを基にクライテリアを設定し、新規分析法の開発に着手した.

第二章では、タンパク質構成アミノ酸鏡像体の標準液を用いて、D-アミノ酸分析法の開発(キラル分離のコンセプトの実証)を行っている。キラルカラム(CROWNPAK CR-I)と LC-TOFMS(TripleTOF 5600)を用い、通常用いられる逆相モードで分析したところ良好な結果は得られなかった。しかし HILIC モードでの分析を試みたところ、鏡像体分離が劇的に改善され、最終的に 15 分の一斉分析が可能となった。また、移動相の有機溶媒比率が増したことによりイオン化効率も改善され、ピーク強度は 10 倍以上に向上した。さらに、分離メカニズムに関して「3 点窪み仮説」を提唱し、実験データと照らし合わせたところ、仮説は強く支持された。

第三章では、第二章で開発した分析法を発展させ、食品中 D-アミノ酸定量のための分析条件の最適化(実サンプルへの応用)を行っている。その結果、分析時間は10分となり、検量線の直線性、ならびに良好な鏡像体ピークの分離能を備えていることが確認できた。そして、その分析法を用いて食品(黒酢、キムチ、ヨーグルト)中 D-アミノ酸の定量に成功している。さらに、他施設で実施・報告されていた黒酢中 D-アミノ酸のデータと比較し、新規分析法で検出されたD-アミノ酸の種類は、他施設の既存分析法で得られたデータと比べても遜色ないことが示された。

第四章では、タンパク質構成アミノ酸以外のアミン類以との同時分析の可能性を検討している。その結果、タンパク質構成アミノ酸を含め 100 種類以上のアミノ酸・アミン類の分析に成功した。

第 5 章では、以上のような研究の総括と展望について述べ、新規分析法に残された問題点(検出感度と二級アミンの分離)とそれらの解決策をについて述べている。

以上,本研究によって,新規分析法は当初掲げた3 つの目標を大きく上回り,既存の分析法に比べ,簡便かつ堅牢なアミノ酸・アミン類の分析法であることが示され,幅広い分野において本法が今後用いられていくことが期待される.よって本論文は博士論文として価値あるものと認める.