

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

博士論文

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

2017 年 4 月

大阪大学大学院 工学研究科
生命先端工学専攻 生物工学コース
生物資源工学領域

紺屋 豊

目次

略語	1
第一章 緒論	2
1-1. 緒言	2
1-2. 従来の D-アミノ酸分析法の比較と新規分析法の目標設定	4
1-3. 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)	9
第二章 標準液を用いた D-アミノ酸一斉分析法の開発と分離メカニズム	11
2-1. 緒言	11
2-2. CROWNPAK CR-I カラム	12
2-3. 実験方法	15
2-3-1. 試薬	15
2-3-2. アミノ酸鏡像体混合標準溶液の調製 (DL-20mix)	16
2-3-3. 分析	17
2-4. 結果と考察	18
2-4-1. 逆相モードでの検討	18
2-4-2. HILIC モードでの検討	19
2-4-3. ピーク強度の向上	24
2-4-4. 分離メカニズムの考察	25
2-5. 小括	33
第三章 食品中 D-アミノ酸の定量(実サンプルへの応用)	34
3-1. 緒言	34
3-2. 実験方法	34
3-2-1. 試薬	34
3-2-2. マトリックス(食品サンプル)	34
3-2-3. 検量線用アミノ酸混合標準溶液の調製 (DL-20mix calibration standard solutions)	35
3-2-4. 内部標準物質標準液の調製 (IS-solution)	35
3-2-5. 検量線サンプルの前処理	36
3-2-6. 黒酢およびヨーグルトの前処理	36
3-2-7. キムチの前処理	36
3-2-8. 回収率検討用サンプルの前処理	37
3-2-9. 分析	38
3-2-10. 回収率の計算	38
3-2-11. D-アミノ酸濃度の算出	39

3-2-12. 標準液中 D/L-アミノ酸のピーク面積比	39
3-3. 結果と考察	39
3-3-1. 移動相組成の最適化	39
3-3-2. D/L-アミノ酸のピーク面積比	41
3-3-3. 定量法のバリデーション	43
3-3-4. 食品中 D-アミノ酸の定量	44
3-3-5. 食品サンプル中 D-allo-isoleucine (D-allo-Ile) の確認	46
3-3-6. ピーク同定の信頼度の確認	47
3-4. 小括	49
第四章 測定対象化合物の拡張	50
4-1. 緒言	50
4-2. 実験方法	51
4-2-1. 試薬	51
4-2-2. アミノ酸・アミン類の混合標準液の調製, 組合せ	51
4-3. 結果と考察	53
4-3-1. アミノ酸・アミン類のピーク形状と分離度	53
4-4. 小括	59
第五章 総括と展望	60
謝辞	62
引用文献	63
発表論文	66
学会発表	67
付録	69
付録 1-1. 3 つの施設で測定された黒酢中 D-アミノ酸の定量値と比率(%D)	69
付録 2-1. CROWNPAK CR-I カラム取扱説明書	70
付録 2-2. CROWNPAK CR-I(+) アミノ酸・アミン・アミノアルコール分離例	71
付録 3-1. 検量線サンプルと食品ブランクサンプルの LC-MS クロマトグラム	72
付録 3-2. 食品サンプル(黒酢, キムチ, ヨーグルト)の LC-MS クロマトグラム	75
付録 3-3. 検量線(Water)の真度と精度	77
付録 3-4. 食品サンプルからの D-アミノ酸回収率(%)	78

略語

ACN : Acetonitrile, アセトニトリル

ALS : Amyotrophic lateral sclerosis, 筋萎縮性側索硬化症

CE-FD : Capillary electrophoresis–fluorescence detection, キャピラリー電気泳動蛍光検出

EtOH : Ethanol, エタノール

HILIC : Hydrophilic interaction chromatography, 親水性相互作用クロマトグラフィー

LC : Liquid chromatography, 液体クロマトグラフィー

LC-FLD : Liquid chromatography–fluorescence detection, 液体クロマトグラフィー蛍光検出

LC-MS : Liquid chromatography–mass spectrometry, 液体クロマトグラフィー質量分析

LC-TOFMS : Liquid chromatography–time of flight mass spectrometry, 液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析

MeOH : Methanol, メタノール

MS : Mass spectrometry, 質量分析

TFA : Trifluoroacetic acid, トリフルオロ酢酸

タンパク質構成アミノ酸

Ala	Alanine	Gly	Glycine	Pro	Proline
Arg	Arginine	His	Histidine	Ser	Serine
Asn	Asparagine	Ile	Isoleucine	Thr	Threonine
Asp	Aspartic acid	Leu	Leucine	Try	Tryptophan
Cys	Cysteine	Lys	Lysine	Tyr	Tyrosine
Gln	Glutamine	Met	Methionine	Val	Valine
Glu	Glutamic acid	Phe	Phenylalanine		

その他のアミノ酸, アミン

β -Ala	β -Alanine	GABA	γ -Aminobutyric acid
α -ABA	α -Aminobutyric acid	<i>allo</i> -Ile	<i>allo</i> -Isoleucine
β -AIBA	β -Aminoisobutyric acid	<i>allo</i> -Thr	<i>allo</i> -Threonine
DMG	<i>N,N</i> -Dimethylglycine	<i>nor</i> -Val	Norvaline
Dopa	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-alanine		

第一章 緒論

1-1. 緒言

地球上の生命体にとってアミノ酸は主要な化合物である. その中でも 20 種類のタンパク質構成アミノ酸は生体内での存在量が多く, タンパク質やペプチドの構成成分として, あるいは遊離体として存在し, 多彩な機能を担っている.

Glycine を除くタンパク質構成アミノ酸はいずれも分子内に不斉炭素を持ち, 鏡像体 (L-体と D-体) (図 1-1) が存在するが, 自然界での存在比は L-体 (L-アミノ酸) に大きく偏っている. 両者は旋光性以外の物理化学的性質が全く同じであるため, L-アミノ酸に比べ微量しか存在しない食品や生体試料中の D-アミノ酸を, L-アミノ酸共存下から分離して検出することは技術的に非常に難しい. それゆえ過去には, 細菌の細胞壁の主要構成成分であるペプチドグリカンなど, ごく限られた場所において D-アミノ酸の存在が確認されていたものの, 高等生物の生体内から D-アミノ酸は検出されず, L-アミノ酸のみが存在すると考えられていた (1).

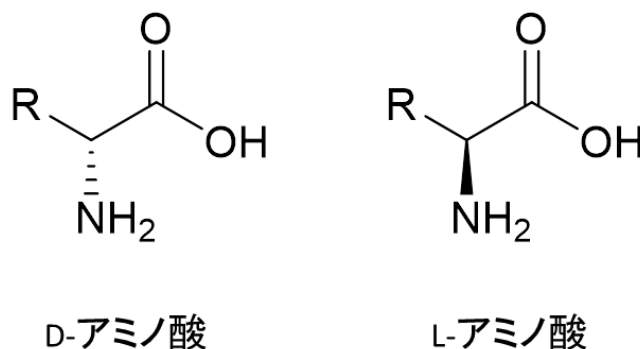


図 1-1. アミノ酸の鏡像体 (R: 側鎖)

しかし分析技術の進歩に伴い 1980 年代以降, ヒトを含む高等生物においても D-アミノ酸の存在が明らかとなってきた (2). そして, 鏡像体を区別しない従来の方法 (アキ

ラル分析)では得られなかった情報や価値が,キラル分析を行うことにより得られたという事例がいくつも報告され,医療や食品をはじめ様々な分野でD-アミノ酸が注目・研究されるようになった.

例えばヒトでは,血液や尿中からも数種類の遊離型 D-アミノ酸の存在が確認されているだけでなく (2-4),統合失調症や筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS),腎機能不全,皮膚の老化などの疾患と D-アミノ酸の関連性が報告されている (5-9).水棲甲殻類では D-Ala が浸透圧を調節する化学物質として機能することが知られている (10).一方,タンパク質中の D-アミノ酸については,水晶体に存在するクリスタリン (Crystallin) 中 L-Asp 残基の加齢に伴う異性化と白内障との関連が報告されている (11).D-アミノ酸は,醗酵食品や生鮮食品などにも存在し (9, 12-14),対応するL-アミノ酸とは異なる呈味を有することが知られている (14).

哺乳類の体内に存在する遊離型 D-アミノ酸の由来としては,①哺乳類が発現するラセマーゼによる生合成,②腸内細菌が産生する遊離型 D-アミノ酸の血中移行,③食品中に含まれる遊離型 D-アミノ酸の血中移行,などの報告がなされている (9).

このように,D-アミノ酸が高等生物の体内にも存在し,様々な生理機能やバイオマーカーとしての役割を有することが明らかになると,それらの現象との関係を裏付ける根拠として D-アミノ酸の正確な存在量を押さえておきたいという要望が生まれてくる.実際,D-アミノ酸分析法に関してこれまで様々な報告がなされており,その多くは鏡像体の分離手段として液体クロマトグラフィー (LC) を用いている (15-16).ただし,既存の分析法では誘導体化処理が必要であったり,鏡像体の分離能や夾雑ピークとの分離が不十分,スループットが低いといった問題点が存在している.それゆえ,簡便かつ堅牢で,高速・高分離能を有する D-アミノ酸一斉分析法の開発が期待されてきた.

とはいえ,20種類のタンパク質構成アミノ酸の側鎖は物理化学的性質が多様(親水性/疎水性,酸性/塩基性,環状等)なため(図 1-2),鏡像体の分離を考慮しなくとも,こ

これら全てのアミノ酸を一斉分析するには高いクロマト分離技術が要求される。よって、それに加えて鏡像体の分離も同時に達成するという事は、非常に高難度の課題と言える。

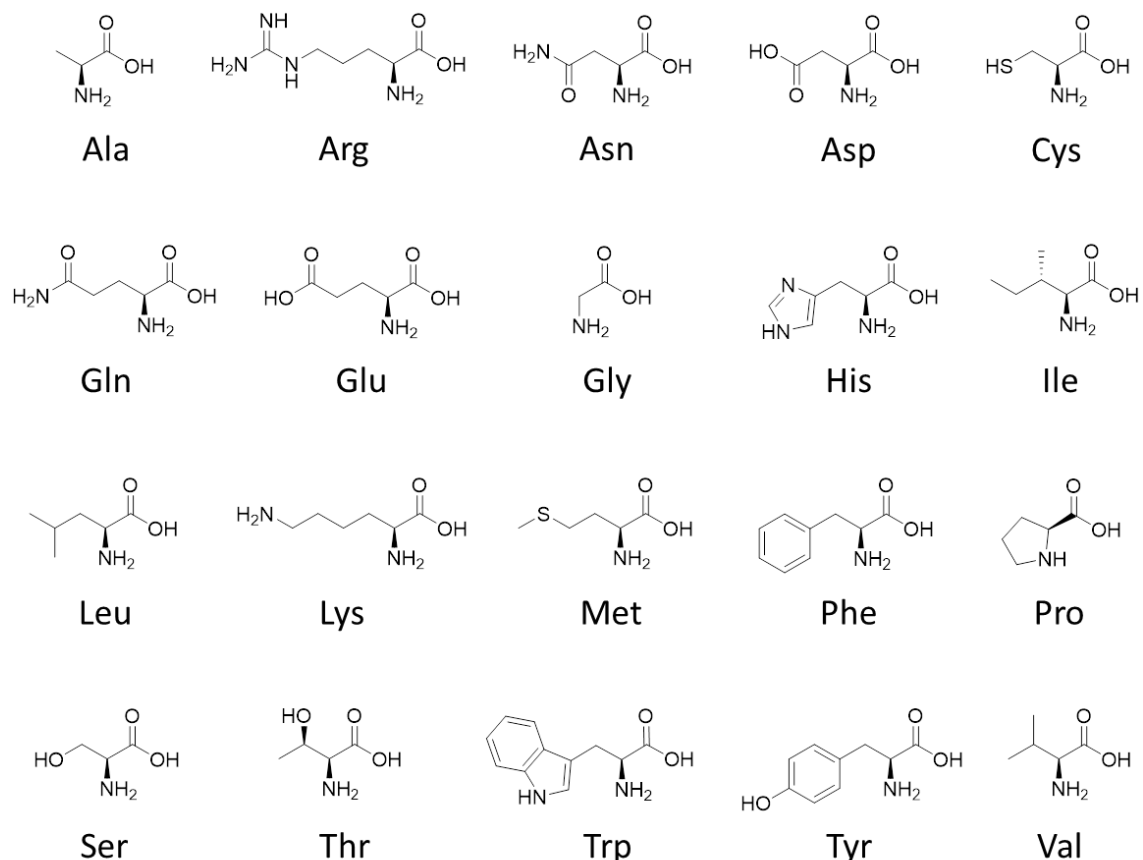


図 1-2. タンパク質構成アミノ酸の構造

側鎖は多様な物理化学的性質を有する。Gly のみ不斉炭素無し(その他はいずれも L-体)。

1-2. 従来の D-アミノ酸分析法の比較と新規分析法の目標設定

LC を用いたアミノ酸の一斉分析には、主に二つのアプローチがある(表 1-1)。一つは Indirect method(誘導体化法)と称され、誘導体化処理を必要とし、誘導体化されたアミノ酸を検出する方法である。もう一方は Direct method(非誘導体化法)と称され、誘導体化処理は行わずに遊離型アミノ酸をそのままの形で検出する方法である。

表 1-1. LC を用いた Indirect method (誘導体化法) と Direct method (非誘導体化法) の比較

カテゴリー	Indirect method (誘導体化法)	Direct method (非誘導体化法)
誘導体化	要	不要
主に用いられて いる検出器	蛍光検出器 または, 質量分析計	質量分析計
備考	ピーク形状や検出感度の面 で有利. 報告例は多い (誘導体化試薬の構造により, 検出感度が決まる)	キラルカラムの選択と クロマト分離条件が重要 (各アミノ酸のイオン化効率に より, 検出感度が決まる)

誘導体化法はその名の通り, 誘導体化処理が必要であり, 図 1-3 に示す NBD-F のように, 蛍光を発する試薬を用いて誘導体化すれば, 蛍光検出も可能で, そうでない場合は質量分析計などで検出する. 蛍光検出法では化合物に関係なく同一蛍光波長を用いて検出することになるため, 夾雑ピークやノイズの影響を受けやすい. ただし, アミノ酸分析において誘導体化法は, 非誘導体化法に比べ良好なクロマトグラムが得られやすく, アミノ酸の種類に関係なく誘導体化試薬の構造に応じて同レベルの高感度検出が期待できる.

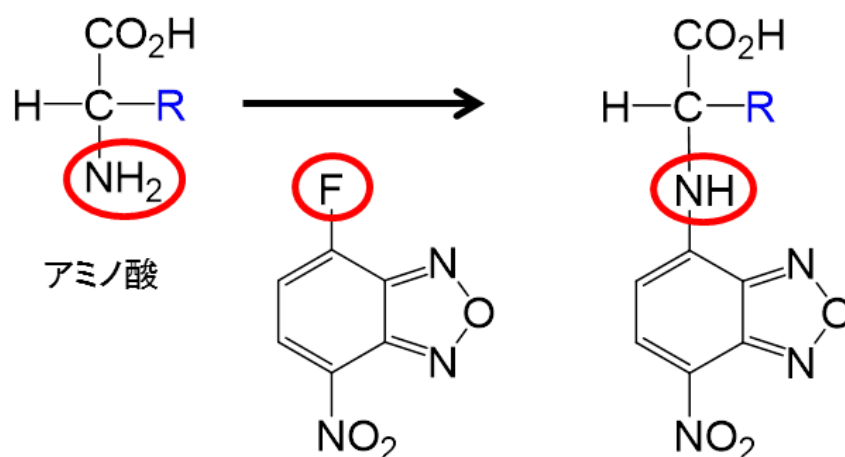


図 1-3. NBD-F 試薬によるアミノ酸の誘導体化反応
(NBD-F: 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole)

一方、非誘導体化法ではキラルカラムを用いてアミノ酸の鏡像体をクロマトグラム上で分離する必要があり、通常は質量分析計を用いて検出する。「誘導体化処理が不要」という利点はあるものの、多様な物理化学的性質を有するアミノ酸全てに対して、単一の分析条件で良好なピーク形状・分離を得ることは非常に難しい。

このような理由から、アミノ酸の一斉分析には誘導体化法が一般的に用いられてきた。実際、日本国内においても、キラルアミノ酸の一斉分析を精力的に行っている主要な3つの研究グループ「①浜瀬・三次ら(九州大)(2, 17), ②老川・郷上ら(関西大)(12, 18), ③大島・牟田口ら(大工大)(13)」は、誘導体化試薬の種類やLC条件は異なるものの、いずれも誘導体化したアミノ酸を蛍光検出する分析法を採用している。

表 1-2. LC を用いた既存の代表的なキラルアミノ酸分析法の比較

カテゴリー	誘導体化法			非誘導体化法	
誘導体化	要			不要	
研究グループ (引用文献)	Müller (3)	老川 (12, 18)	浜瀬 (2, 17)	Taujenis (20)	Barbaro (21)
分析装置	LC-TOFMS	LC-FLD	2D-LC-FLD	LC-MS/MS	LC-MS/MS
分析時間 (アミノ酸 20 種類)	35 分	90 分 + 60 分	約 900 分	15 分	35 分
単一分析条件で 分離可能な 鏡像体の種類 (アミノ酸 19 種類)	17 種類	2つの分析 条件を併用	二次元目は アミノ酸ごとに 条件が異なる	15 種類	14 種類
拡張性 (その他のアミン類)	なし	1 化合物	20~30 化合物	なし	2 化合物

LC-TOFMS : Liquid chromatography-time of flight mass spectrometry, 液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析

2D-LC-FLD : Two-Dimensional Liquid chromatography-fluorescence detection, 二次元液体クロマトグラフィー蛍光検出

LC-MS/MS : Liquid chromatography-tandem-mass spectrometry, 液体クロマトグラフィータンデム型質量分析

表 1-2 には LC を用いた代表的なキラルアミノ酸分析法を記した。浜瀬・三次らは、誘導体化試薬としてアキラルな化合物(NBD-F)を用い、クロマト分離には二次元 LC 法を採用している (2)。そのため分析時間は非常に長くなっているが、スループット (分析時間)を犠牲にしている理由として、「実試料中に存在する D-アミノ酸を分析するための感度領域においては、L-アミノ酸を分析する感度領域と比べると想像できない多数の夾雑成分が存在するため、高選択的な方法が必須である」と述べている (17)。

一方、非誘導体化法の検出器としては質量分析計が主に用いられているが、アミノ酸は親水性のものが多く、脂質などの疎水性化合物に比べると、イオン化室内でのイオン化が起きにくいいため、高感度化が難しい。それゆえ、この欠点も誘導体化法のほうが一般的に用いられてきた理由となっている。

しかし、簡便かつ堅牢で、高速の D-アミノ酸一斉分析法の確立には、誘導体化法の利点よりも、誘導体化に伴う諸問題(夾雑ピーク、試薬の純度、誘導体化反応の効率や生成物の安定性等)を回避するほうが得策と判断した(表 1-3)。そこで、新規 D-アミノ酸一斉分析法の開発には非誘導体化法を検討することにした。その性能目標は既存の分析法(表 1-2)のほぼ最高レベルと照らし合わせ、「①タンパク質構成アミノ酸(20種類)の一斉分析に要する時間は30分以内」「②15種類以上のアミノ酸鏡像体を分離」「③タンパク質構成アミノ酸以外に30種類以上の非タンパク質構成アミノ酸やアミン類の同時分析も可能」とした(表 1-3)。

また、分析法の実用性には、検出感度も重要な評価項目となる。黒酢は食品の中でも種類、量とも D-アミノ酸を多く含むとの報告が複数あることから、評価に用いる試料として最適と考えた。そして3つのグループからの報告(定量値)(13, 23, 24)を比較したところ、最低濃度は 2.5 nmol/mL、最高濃度は 887 nmol/mL であることより(付録 1-1)、定量範囲に関しては、アミノ酸の種類に関係なく一律 1~1000 nmol/mL の範囲でまず検量線を作成し、バリデーションの結果から定量下限を設定することにした。

表 1-3. 新規キラルアミノ酸分析法の性能目標

項目	方法/目標	備考(選択/設定理由)
カテゴリー	Direct method (非誘導体化法)	誘導体化処理の工程や試薬費が不要という点以外に, 下記の項目を懸念しなくてよい. <ul style="list-style-type: none"> ・誘導体化試薬の純度 ・誘導体化反応の効率 ・生成した誘導体の安定性 ・副生成物の生成
検出装置	TOFMS (飛行時間型質量分析計)	精密質量による分離を行うことで, <ul style="list-style-type: none"> ・夾雑ピークやノイズの低減 ・網羅的検出が可能 ・測定対象の拡張が容易 ・未知ピークの推定に有利
LC モードと分析時間	逆相/グラジエント 30 分以内	既存法はいずれも逆相モード/グラジエント条件で分析
分離能 (タンパク質構成アミノ酸 19 種)	15 種類以上の完全分離	<ul style="list-style-type: none"> ・Gly は不斉炭素なし ・Pro (第二級アミン) は, OPA (o-Phthaldialdehyde) では誘導体化不可 ・Cys は不安定で, 試料中に存在しない可能性大 ・表 1-2 の非誘導体化法 (20, 21) では, どちらも Ile と Leu の分離は不可
測定対象の拡張 (その他のアミン類)	30 化合物以上	浜瀬法と同等レベル

1-3. 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)

本研究においてLC条件を検討するにあたり、最終的にはメーカー推奨の逆相モードではなく、HILICモードを採用したことにより劇的な鏡像体分離の改善がなされた。実験結果の詳細や分離のメカニズムについては第二章で考察することにし、ここではLC分析で通常用いられている3つの分離モード(逆相, HILIC, 順相)の違いについて、図1-4を用いながら簡単に説明する。

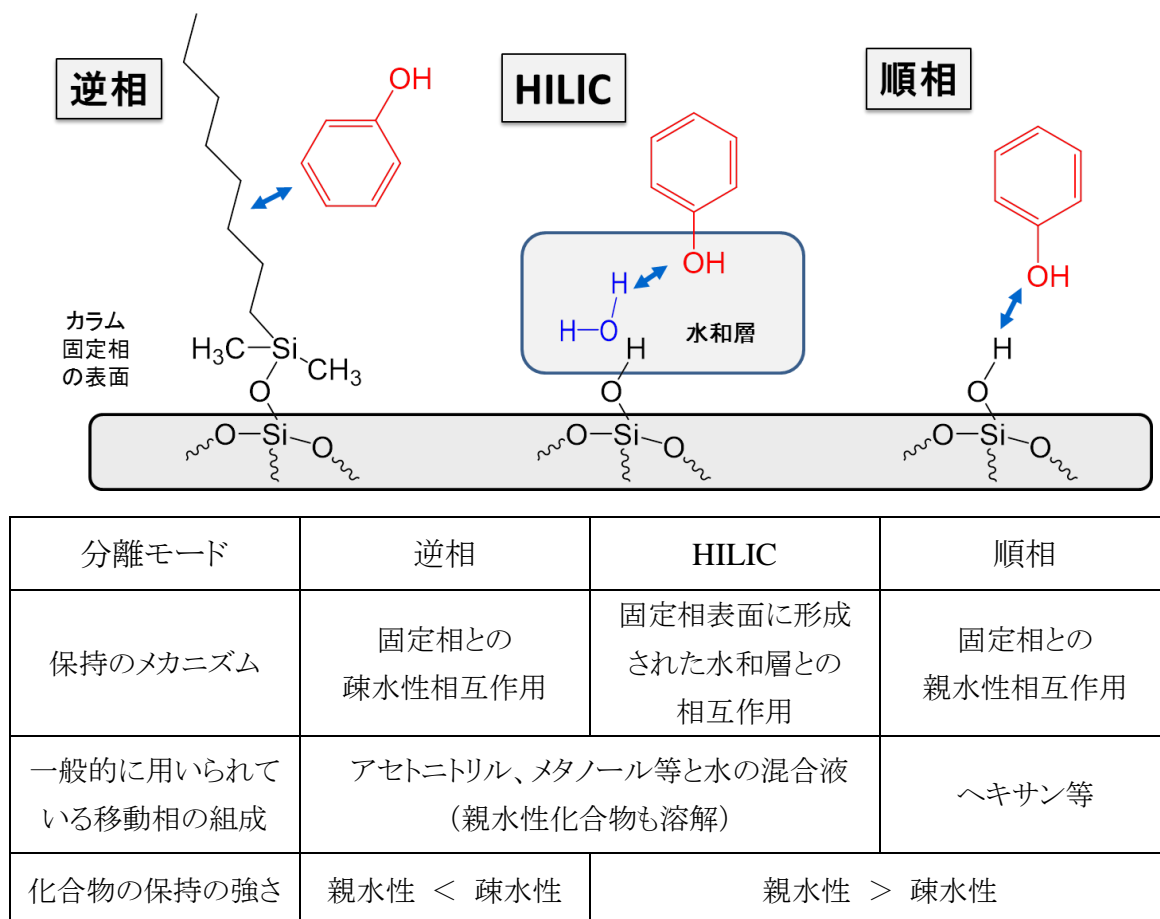


図1-4. LC分離モードの概念図(逆相・HILIC・順相)

HILICモードでは、用いられる移動相組成は逆相モードに近く、保持の強さ(化合物の溶出順)は順相モードに近い。

3つの中で最も一般的に用いられているのは逆相モードである。親水性化合物の保持という点では、逆相モードよりも順相モードのほうが有利だが、順相モードの移動相としてよく用いられているヘキサンなどにアミノ酸はほとんど溶解しないため、通常は逆相モードで分析されることが多い。

HILIC は有機溶媒 (ACN, MeOH など) と水または緩衝液の混合溶媒を移動相とした順相クロマトグラフィーの一種である。HILIC モードで用いる試料は逆相クロマトグラフィーでは保持できないほど極性が高く、従来の順相クロマトグラフィーでは逆に保持しすぎる高極性化合物が対象になる。また、高極性化合物は水を含有しない溶媒には溶けないため、必然的に移動相は水を含んでいなければならない。

移動相の有機溶媒比率が高くなる、言い換えると水の比率が低くなると固定相の表面に水和層が形成される (19)。HILIC モードでは、この水和層を介して分析対象化合物が保持される。用いられる移動相の組成は逆相モードと似ているが、溶出順は順相モードと同じ疎水性の化合物ほど先に溶出される。よって、親水性のアミノ酸も保持させることができる。さらに、質量分析計での検出を考えた場合、移動相中の有機溶媒の比率が高い(水の比率が低い)ほど、イオン化室で脱溶媒しやすく、それに伴いイオン化効率も増すため、逆相モードに比べ検出感度の向上も期待できる。

第二章 標準液を用いた D-アミノ酸一斉分析法の開発と分離メカニズム

(キラル分離のコンセプトの実証)

2-1. 緒言

(CROWNPAK CR-I 以外の既存の非誘導体化法用キラルカラム)

第一章でも述べたように、非誘導体化法には「誘導体化処理が不要」という利点はあるものの、ピーク形状や鏡像体分離が不十分であったり、必要とされる検出感度が得られにくいという欠点のため、誘導体化法に比べると報告例ははるかに少ない(15-16)。裏を返せばこれらの欠点を解決できれば、既存の誘導体化法を凌ぐ可能性を秘めている。

ただし、非誘導体化法はアミノ酸をそのままの形でクロマト分離しなければならないため、カラムの選択と分離条件の検討は、誘導体化法よりも重要となる。

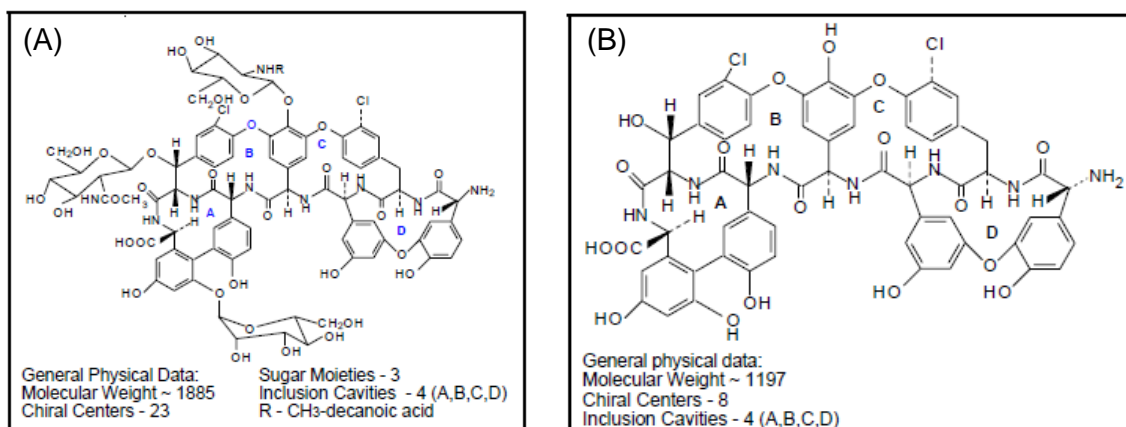


図 2-1. CHIROBIOTICS カラムの固定相のキラルセクター

(A) CHIROBIOTIC T or T2, (B) CHIROBIOTIC TAG

非誘導体化法で使用されているキラルカラムの例 (20, 21).

これまでも様々な非誘導体化法用のキラルカラムが開発・販売されてきた。その中でもグリコペプチド系抗生物質であるテイコプラニン (Teicoplanin) およびそのアグリコン (Aglycone) を結合したキラルカラム (CHIROBIOTIC シリーズ, 図 2-1) を用いたタ

ンパク質構成アミノ酸鏡像体の分析例に関する報告は、他の非誘導体化法用キラルカラムを用いたものより多い(表 1-2 の Taujenis の分析法では CHIROBIOTIC T2 を, Barbaro の分析法では CHIROBIOTIC TAG を使用). しかしそれらを用いても、一斉分析を行った場合、複数のアミノ酸のピーク形状が不良,あるいは鏡像体分離が達成されていない (20, 21).

2-2. CROWNPAK CR-I カラム

CROWNPAK CR-I カラムは化学結合型光学活性クラウンエーテルを使用したキラルカラムで,ダイセル CPI 社(以下,ダイセル社)が開発し,2014年2月に販売が開始された.キラル固定相中の光学活性クラウンエーテル(18-crown-6 型)が化合物の不斉中心近傍の「-NH₃⁺」を包接することにより光学分割し(図 2-2),遊離型 α-アミノ酸のキラル分析やアミン・アミノアルコール類の分析に適しているとされている.

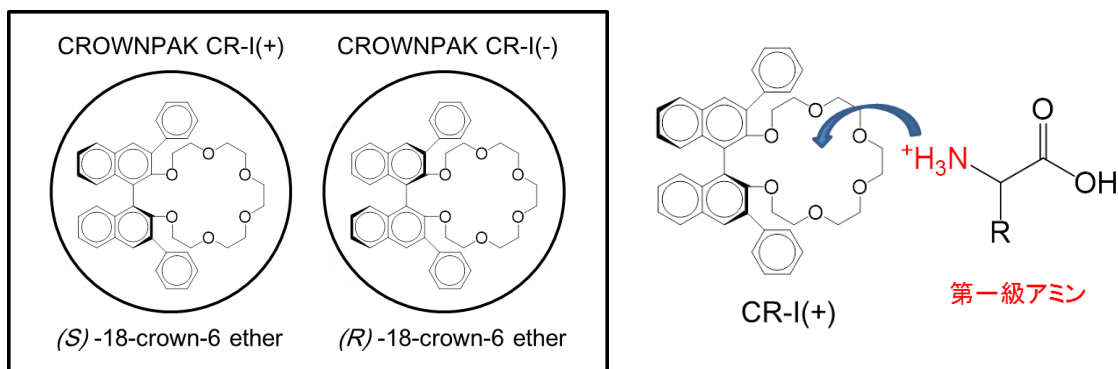


図 2-2. CROWNPAK CR-I のキラルセレクター

第一級アミンを包接し, Binaphthyl の軸不斉により鏡像体を識別.

キラルセレクターの特性上, Proline などの第二級アミンの光学分割はできないが, 以下の特徴を有する. (付録 2-1: カラム取扱説明書)

- 既に販売されていた CROWNPAK CR カラムの高い不斉識別能を維持したまま,

溶剤耐性が付与されたものとなっており、溶媒によるカラムの劣化が防止でき、溶出力の強い有機溶媒も移動相として使えるようになった。

- ・ 酸性条件下 (pH=1.0~2.0) での使用で、良好なキラル分離が得られやすい。
- ・ CR-I(+)カラムを使用するとD-アミノ酸が先に溶出し、CR-I(-)カラムを使用すると溶出順序を逆転(L-アミノ酸を先に溶出)させることができる。
- ・ 推奨移動相は「アセトニトリル/ 過塩素酸水溶液 (pH=1.5) = 20 / 80 (v/v)」で、硝酸やトリフルオロ酢酸など、過塩素酸以外の酸も使用できるが、過塩素酸を使用したほうが分離力は高い。

ダイセル社においても、アミノ酸鏡像体の分離検討は既になされており、「CROWNPAK CR-I(+) アミノ酸・アミン・アミノアルコール分離例」としてまとめられていた(付録 2-2)。その一例を図 2-3 に示した。

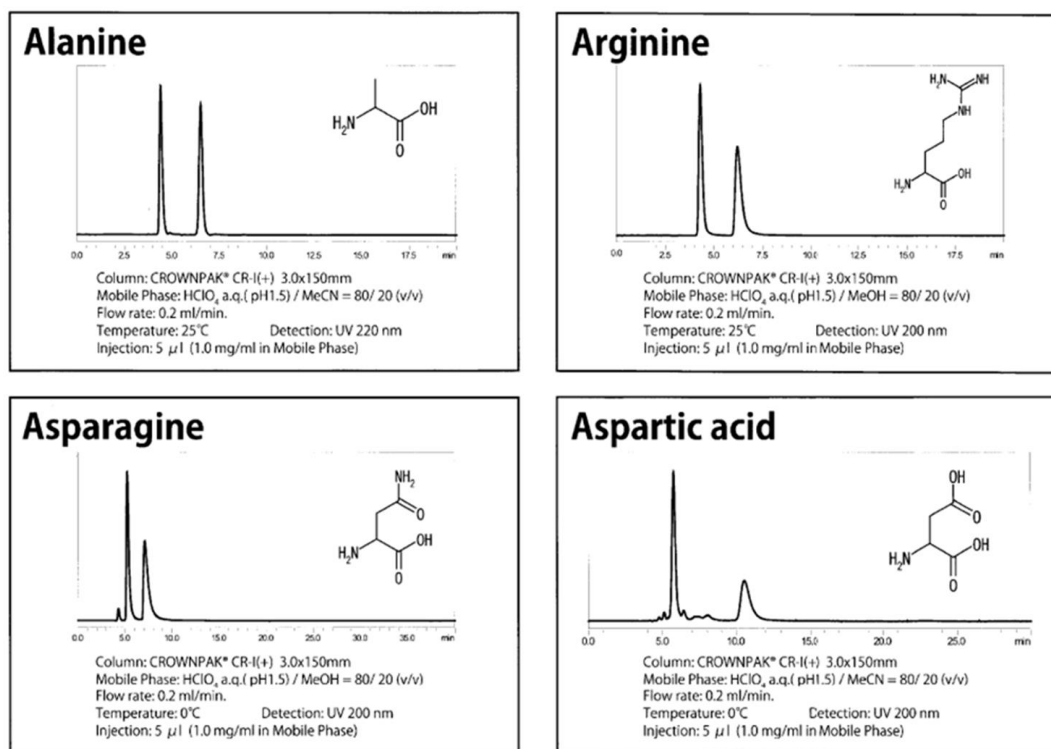


図 2-3. CROWNPAK CR-I(+)カラムを用いたダイセル社のアミノ酸鏡像体の分離例

個々のアミノ酸に対して異なる分析条件(移動相組成、カラム温度)を使用

そこで、この資料に記載されている分析条件の中から、18種類のタンパク質構成アミノ酸それぞれの移動相組成とカラム温度を抽出し、表 2-1 にまとめた。

表 2-1. CROWNPAK CR-I カラムを用いた各アミノ酸の分析条件の比較(ダイセル法)

番号	アミノ酸	移動相組成 ^a	カラム温度(°C) ^b
1	Leu	A15	25
2	Asp	A20	0
3	His		
4	Ser		
5	Thr		
6	Ala		
7	Cys		25
8	Glu		
9	Tyr		
10	Val		
11	Met		
12	Phe	A30	
13	Trp	A50	
14	Asn	M20	0
15	Arg		25
16	Gln		
17	Ile		
18	Lys		

個々のアミノ酸に対して異なる分析条件(移動相組成、カラム温度)を使用

- a : 移動相は有機溶媒と過塩素酸水溶液(pH=1.5)を混合して調製しており、表中の「A15」は移動相のアセトニトリルの比率が15%、「M20」はメタノールの比率が20%であることを意味する。
- b : カラム温度と流速の基本設定は「25°C, 0.2 mL/min」であるが、分離不十分な場合は、カラム温度を0°Cに下げて分析。

表 2-1 の内容を補足説明すると、

- ・ 過塩素酸水溶液(pH=1.5)と混合する有機溶媒はアセトニトリル(ACN)またはメタ

ノール(MeOH)のどちらかで、混合比は有機溶媒の比率が 15~50% (逆相モード) というように、アミノ酸ごとに異なる。

- 基本分析条件として、カラムオープン(クーラー)の温度は 25°C, 流速は 0.2 mL/min に設定されているが、移動相組成の変更だけでは鏡像体分離が達成できなかった 5 種類のアミノ酸(Asp, His, Ser, Thr, Asn)に関しては、温度を 0°C に下げてカラムへの保持を強めることで分離を達成している。

以上のように、ダイセル法では個々のアミノ酸において鏡像体分離が達成されているものの、全アミノ酸に対して共通の分析条件は存在していなかった。しかも、カラム温度 25°C で分離できなかった一部のアミノ酸については、カラムを冷却(0°C)することで対応していた。一斉分析において、分析の途中で移動相組成を変えていくグラジエント分析はよく用いられている手法である。一方、カラム温度を途中で変えることは、スループットや温度コントロールの再現性を考えると非現実的である。

ただしダイセルの事例(クロマトグラム)を見ると、ピーク形状と鏡像体分離は概ね良好であり、CR-I(+)カラムと CR-I(-)カラムを使い分けることにより鏡像体の溶出順を反転させることができる点など、魅力的な特徴をいくつか有していた。そこで、カラムのパフォーマンスを確認する目的で、いくつかの条件を試すことにした。

2-3. 実験方法

2-3-1. 試薬

Ultrapure Water for LC/MS (Water) と Trifluoroacetic acid for HPLC (TFA), 0.1 mol/L Hydrochloric Acid for Volumetric Analysis は和光純薬工業(大阪, 日本)から。Acetonitrile -Plus- for LC/MS (ACN) は関東化学(東京, 日本)から購入した。

タンパク質構成アミノ酸の標準品の購入先については、表 2-2 にまとめて記した。

表 2-2. タンパク質構成アミノ酸の略語と購入先

試薬名	略語	購入先
DL-Alanine	DL-Ala	
DL-Arginine Hydrochloride	DL-Arg	
DL-Asparagine Monohydrate	DL-Asn	
DL-Aspartic Acid	DL-Asp	
DL-Cysteine Hydrochloride Monohydrate	DL-Cys	
DL-Glutamic Acid	DL-Glu	
DL-Glutamine	DL-Gln	
DL-Histidine	DL-His	
DL-Isoleucine (mixture of four stereoisomers containing DL- <i>allo</i> -isoleucine)	DL-Ile (DL- <i>allo</i> -Ile)	東京化成工業 (東京, 日本)
DL-Leucine	DL-Leu	
DL-Lysine Monohydrochloride	DL-Lys	
DL-Methionine	DL-Met	
DL-Phenylalanine	DL-Phe	
DL-Proline	DL-Pro	
DL-Serine	DL-Ser	
DL-Threonine	DL-Thr	
DL-Tryptophan	DL-Trp	
DL-Tyrosine	DL-Tyr	
DL-Valine	DL-Val	
Glycine	Gly	和光純薬工業 (大阪, 日本)

2-3-2. アミノ酸鏡像体混合標準溶液の調製(DL-20mix)

50%MeOH は MeOH と Water を混合(1/1 (v/v))して調製した. 50%MeOH-0.05 mol/L-HCl または 50%MeOH-0.02 mol/L-HCl は, MeOH と 0.1 mol/L Hydrochloric Acid または 0.04 mol/L Hydrochloric Acid を混合(1/1 (v/v))して調製した.

DL-Asp と DL-Tyr は 50%MeOH-0.05 mol/L-HCl で, DL-Glu, DL-His および DL-Trp は 50%MeOH-0.02 mol/L-HCl で, それ以外のアミノ酸鏡像体と Gly は 50 %MeOH で

溶解し、20 $\mu\text{mol/mL}$ 標準液を化合物ごとに調製した。ただし、Gly を除く各標準液中には D-アミノ酸と L-アミノ酸が等量ずつ含まれていると推定されるため、各鏡像体を区別した濃度はそれぞれ半分の 10 $\mu\text{mol/mL}$ (D-Ile, L-Ile および D-*allo*-Ile, L-*allo*-Ile は 4 つの異性体の混合溶液なので各 5 $\mu\text{mol/mL}$) となる。

次に 19 種類のアミノ酸鏡像体と Gly を合わせた計 20 種類の各標準液 (20 $\mu\text{mol/mL}$) を等量ずつ混合し、各濃度が 1000 nmol/mL となる混合標準液 (DL-20mix-1000) を調製した。

2-3-3. 分析

アミノ酸鏡像体混合標準液の分析には、LC システム:Nexera (ポンプ:LC-30AD, オートサンプラー:SIL-30AC, デガッサー:DGU-20A5, カラムオーブン:CTO-30A, 島津製作所, 京都, 日本), 分析カラム:CROWNPAK CR-I(+)(3.0 mm i.d. \times 150 mm, and 5 μm particle size, ダイセル CPI, 大阪, 日本), TOFMS:TripleTOF 5600 System (AB SCIEX, コンコルド, カナダ)を用いた(表 2-3-1 および表 2-3-2)。

2-3-2 項で調製したアミノ酸混合標準液 (DL-20mix-1000) は表 2-3-1 の LC 移動相で 20 倍希釈し (50 nmol/mL), 1 μL を LC-TOFMS に注入して分析した。移動相の組成は TFA の比率を 0.5% に固定し, ACN と Water の比率 (v/v) を変えながら, 検討を行った。なお, ダイセル法では UV 検出器が用いられていたが, 我々は TOFMS を検出器として用いるため, 過塩素酸 (HClO_4) の代わりに LC-MS 分析で良く用いられている TFA を移動相に添加することにより pH を強酸性側に調整した。

得られた生データは, MultiQuant (AB SCIEX) を用いて解析した (Extracted ion of $[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 5 \text{ mDa}$) 。

表 2-3-1. LC 分析条件(Nexera system)

カラム	CROWNPAK CR-I(+) (3.0 mm i.d. × 150 mm, and 5 μm particle size)
移動相	ACN/Water/TFA = 50/50/0.5 ~ 98/2/0.5 (v/v/v)
カラム温度 (°C)	30 (or 40)
流速 (mL/min)	0.4
オートサンプラー温度 (°C)	4
サンプル注入量 (μL)	1

表 2-3-2. TOFMS 分析条件(TripleTOF 5600)

イオンモード:Polarity	Positive
カーテングス:CUR (psi)	30
イオンスプレー電圧:ISVF (V)	5500
ヒーター温度:TEM (°C)	600
ネブライザーガス:GS1 (psi)	50
ターボガス:GS2 (psi)	50
デクラスタリング電位:DP (V)	60
コリジョンエネルギー:CE (V)	5
質量範囲 (m/z)	60 - 600

2-4. 結果と考察

2-4-1. 逆相モードでの検討

ダイセル法の分析事例の中で移動相の有機溶媒 (ACN) 比率が最も高かったのは Trp 分析の 50%であった(表 2-1)。そこで条件検討は「ACN/Water/TFA = 50/50/0.5 (v/v/v)」という移動相組成からスタートし、分離不良の場合は ACN の比率を下げたり、ACN を MeOH に置き換えるといった一般的なアプローチを用いて良好な鏡像体分離が達成できる条件を探ることにした。

検討の結果、過塩素酸を TFA に置き換えてもダイセル社の鏡像体分離例(過塩素酸を使用)と似た傾向のクロマトグラムが得られることが確認できた。図 2-4 には、タンパク質構成アミノ酸鏡像体混合標準液(20 種)を逆相モード(移動相組成は

「ACN/Water/TFA = 50/50/0.5」で分析した場合の LC-MS クロマトグラムを示した。この移動相組成では鏡像体の半数以上が共溶出(×印)または分離不良(△印)であった。また、カラム温度 30°Cでは良好な分離が得られないアミノ酸については、氷冷下(0°C)で分析すると、鏡像体の分離は改善するもののピーク形状は大きくテーリングし、しかもカラム圧は数倍上昇した。よって当初の予想通り、「有機溶媒比率やカラム温度を下げるという通常戦略では、一斉分析の確立は困難」という結論に至った。

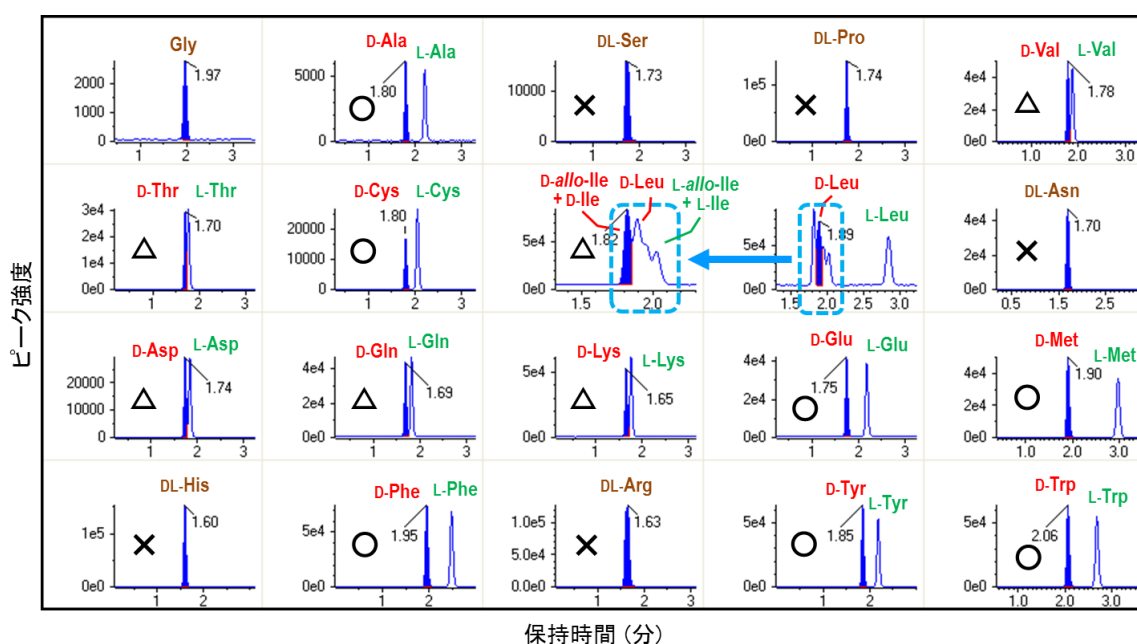


図 2-4. アミノ酸鏡像体混合標準液(20 種)の LC-MS クロマトグラム(逆相モード)
 移動相条件: ACN/Water/TFA = 50/50/0.5 (逆相モード), カラム: CR-I(+), カラム温度: 30°C
 半数以上のアミノ酸鏡像体が共溶出または分離不良 (○:分離良好, △:分離不良, ×:共溶出)
 Gly は不斉炭素無し, Pro は第二級アミンであるため鏡像体は分離不可。

2-4-2. HILIC モードでの検討

キラル分析ではないが、アミノ酸の一斉分析を逆相モードではなく、HILIC モードで分析している報告例はいくつか存在し、専用の分析カラムも市販されている。CROWNPAK CR-I カラム(シリカゲル化学結合型)は前モデルの CROWNPAK CR カラム(コーティング型)とは異なり、有機溶媒への耐性が付与されており、順相モードや

HILIC モード(移動相の ACN 比率が約 70%以上)で使用することも可能である. ダイセル社の資料の中に HILIC モードで分析した事例は無かったが,「HILIC モードでアミノ酸鏡像体を分析した場合,アミノ酸と固定相との相互作用が強まるのと同時に,キラルセクターによる立体障害の効果が鏡像体の片方にだけ強く現れ,結果として鏡像体分離に有利に働くのではないかと推定した.そこで 2-4-1 項とは真逆に,初期移動相「ACN/Water/TFA = 50/50/0.5」から,ACN 比率を上げる方向で検討を進めることにした.その結果,比率を上げていくと分離が劇的に改善されていき,50%では鏡像体が共溶出していた4種類のアミノ酸(Ser, Asn, His, Arg)でも,90%を超えた条件ではベースライン分離を達成することができた(図 2-5).

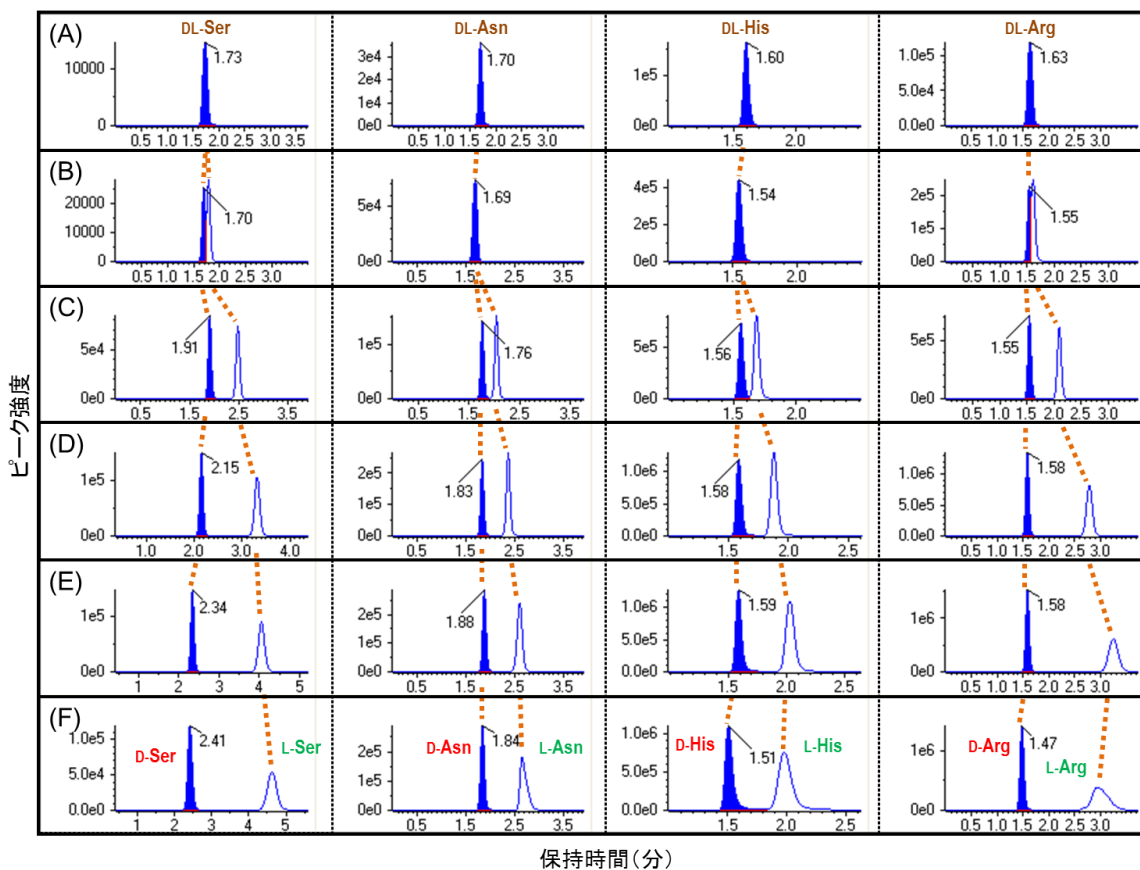


図 2-5. 4 種類のアミノ酸鏡像体の LC-MS クロマトグラム(逆相~HILIC モード)

移動相条件: ACN/Water/TFA = (A) 50/50/0.5, (B) 70/30/0.5, (C) 90/10/0.5, (D) 94/6/0.5,

(E) 96/4/0.5, (F) 98/2/0.5, カラム: CR-I(+), カラム温度: 30°C.

ACN=90%以上の条件で4種類のアミノ酸鏡像体は,いずれもベースライン分離.

また, Ile と Leu は同一の分子量を有し, さらに Ile は分子内に 2 つの不斉炭素を有するため(図 2-6), 質量分析計を用いて検出する場合は, これらの化合物どうしがクロマトグラム上で分離されなければならない。

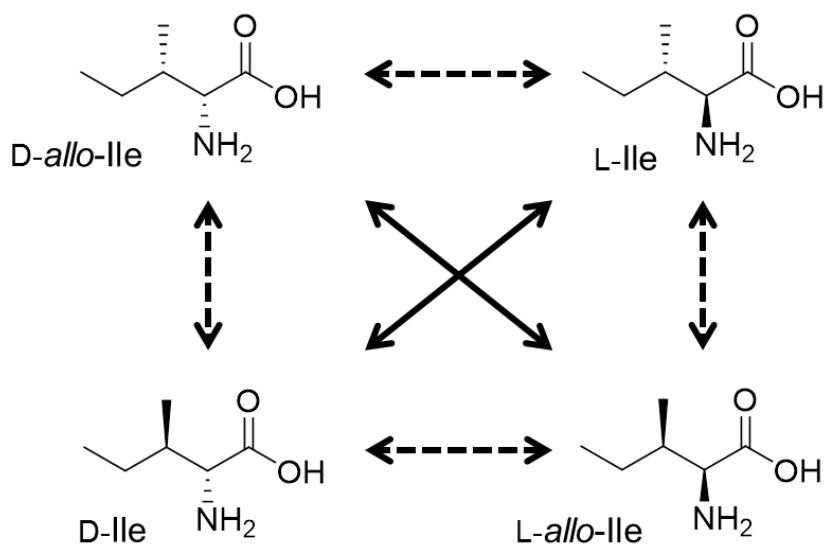


図 2-6. Ile の光学異性体

実線矢印:エナンチオマー, 点線矢印:ジアステレオマー

Ile には分子内に 2 つの不斉炭素(4 つの光学異性体)が存在.

結果として D-Ile と D-allo-Ile は共溶出したものの, D-Ile (D-allo-Ile), D-Leu, L-allo-Ile, L-Ile, L-Leu の 5 つのピークは, ACN 比率を上げることによりベースライン分離することができた(図 2-7). なお, CR-I(+)カラムの代わりに CR-I(-)カラムを用いることにより D-Ile と D-allo-Ile は分離することが可能であり, 詳細は 3-3-5 項に記した。

第二級アミンである Pro の鏡像体は, CR-Iカラムの特性上いずれの移動相条件でも分離されなかった。

以上の結果, カラム温度 30°Cでは「ACN/Water/TFA = 96/4/0.5」という移動相組成が, 最も良い条件であった(図 2-8(A)). そして各ピークの間隔(分離)にはまだ余裕があったので, カラム仕様書記載の「使用温度範囲」の中で最高の 40°Cでも分析した

ところ(図 2-8(B)), 分離度(R_s)は 1.77 以上であった(表 2-4)(日本薬局方では, R_s が 1.5 以上を完全分離と定義している)(22). また, 温度を上げたことにより, 分析対象の中で最も溶出が遅い L-Lys の保持時間は 29.3 分から 12.9 分へと半分以下になり, 分析時間の短縮化も達成した.

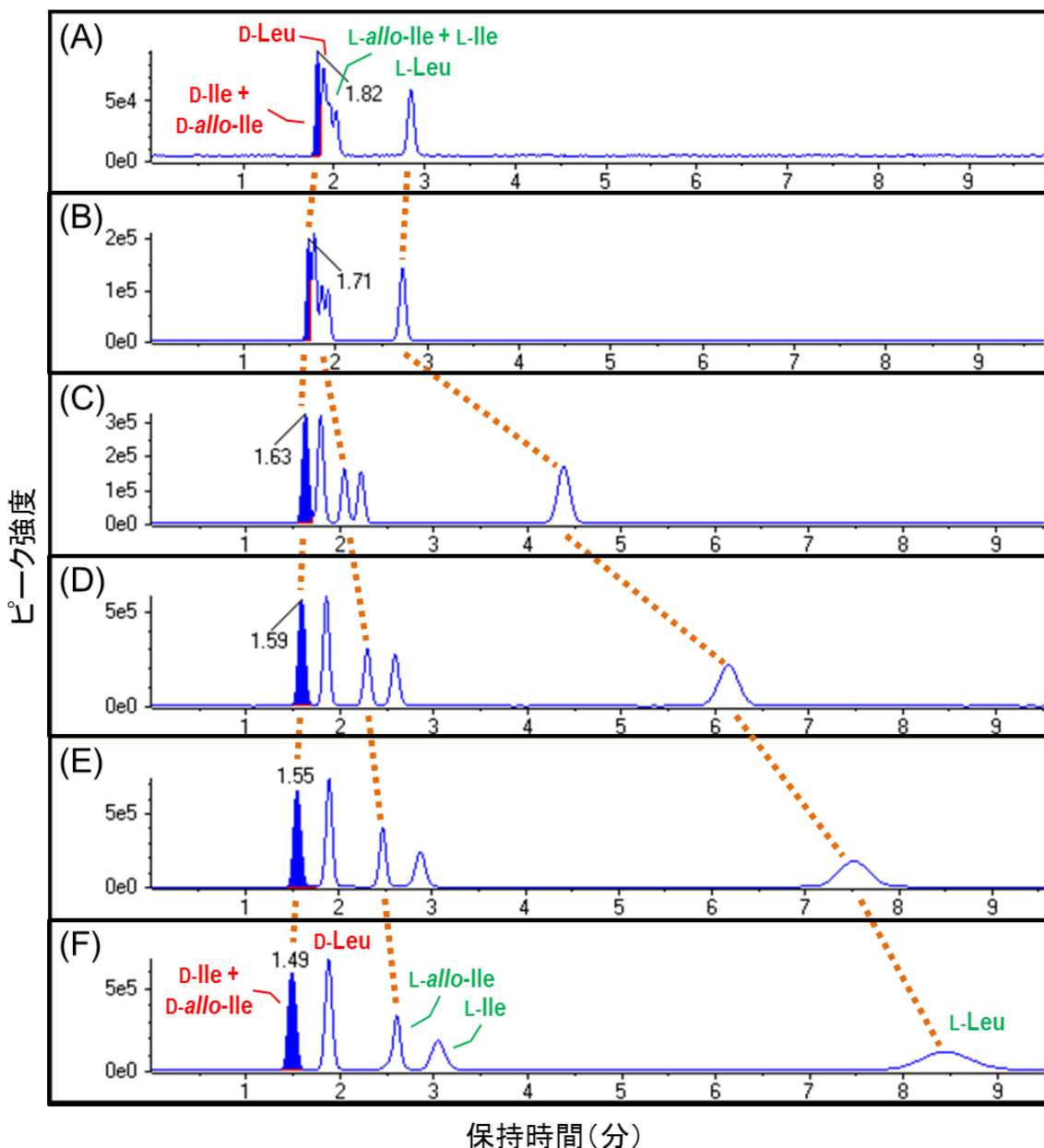


図 2-7. Ile および Leu 鏡像体の LC-MS クロマトグラム(逆相~HILIC モード)
 移動相条件: ACN/Water/TFA = (A) 50/50/0.5, (B) 70/30/0.5, (C) 90/10/0.5, (D) 94/6/0.5,
 (E) 96/4/0.5, (F) 98/2/0.5, カラム: CR-I(+), カラム温度: 30°C,
 ACN=90%以上の条件で, 5 つのピークはベースライン分離(ただし D-Ile と D-allo-Ile は共溶出).

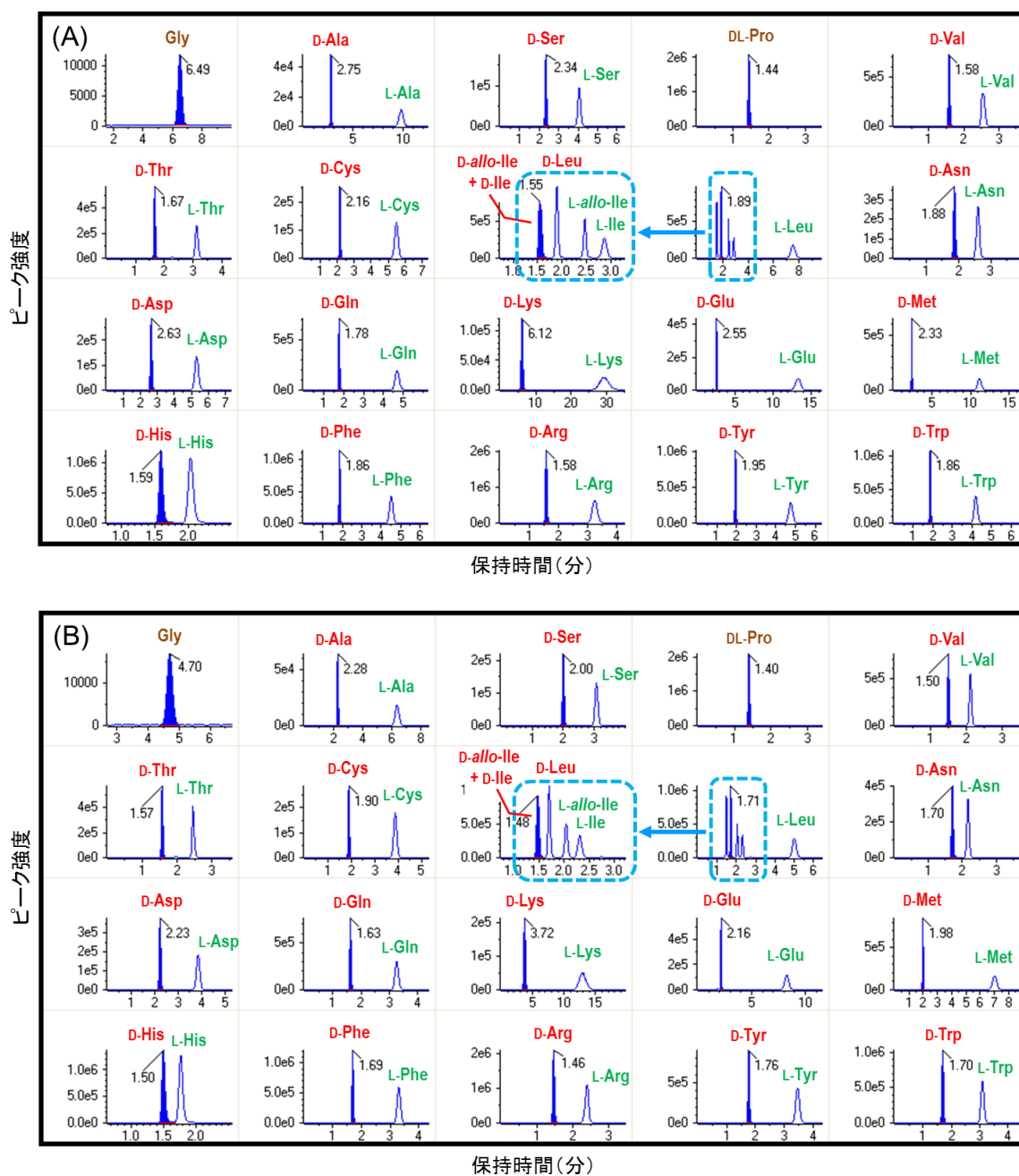


図 2-8. アミノ酸鏡像体混合標準液(20種類)の LC-MS クロマトグラム (HILIC モード)
 移動相条件: ACN/Water/TFA = 96/4/0.5, カラム: CR-I(+), カラム温度: (A) 30°C, (B) 40°C
 Gly(鏡像体無し)および Pro(第二級アミン)を除き, 各鏡像体は完全分離(分離度(Rs)は 1.5 以上).
 最も保持時間が遅かったのは L-Lys(40°Cで分析した場合は 12.9 分).

表 2-4. 各アミノ酸の保持時間 (Rt) と分離度 (Rs)

アミノ酸	[M+H] ⁺	保持時間(分) / カラム温度30°C			保持時間(分) / カラム温度40°C		
		D-体	L-体	分離度(Rs)	D-体	L-体	分離度(Rs)
Gly	76.0399	6.49		—	4.70		—
Ala	90.0555	2.75	9.81	14.62	2.28	6.35	12.31
Ser	106.0504	2.34	4.05	7.76	2.00	3.07	6.31
Pro	116.0712	1.44		—	1.40		—
Val	118.0868	1.58	2.55	6.73	1.50	2.12	5.63
Thr	120.0661	1.67	3.13	9.07	1.57	2.46	7.00
Cys	122.0276	2.16	5.50	11.94	1.90	3.88	9.74
<i>allo</i> -Ile	132.1025	1.55	2.47	(a) 2.87, (b) 5.26 (c) 2.36, (d) 11.20	1.48	2.04	(a) 2.09, (b) 3.00 (c) 1.77, (d) 9.62
Ile	132.1025		2.87			2.31	
Leu	132.1025	1.89	7.52	—	1.71	5.00	—
Asn	133.0613	1.88	2.61	4.31	1.70	2.17	3.47
Asp	134.0453	2.63	5.31	8.55	2.23	3.85	7.35
Gln	147.0770	1.78	4.68	10.69	1.63	3.26	8.74
Lys	147.1134	6.12	29.26	8.08	3.72	12.92	7.29
Glu	148.0610	2.55	13.32	15.13	2.16	8.27	13.87
Met	150.0589	2.33	11.16	15.55	1.98	7.01	14.13
His	156.0773	1.59	2.03	3.25	1.50	1.77	2.45
Phe	166.0868	1.86	4.52	10.82	1.69	3.30	9.05
Arg	175.1195	1.58	3.25	6.80	1.46	2.39	5.78
Tyr	182.0817	1.95	4.76	10.70	1.76	3.46	8.72
Trp	205.0977	1.86	4.19	9.82	1.70	3.09	8.20

移動相: ACN/Water/TFA = 96/4/0.5, カラム温度: 30°C または 40°C

保持時間 (Rt) を t_1 および t_2 ($t_2 > t_1$), ピーク半値幅を w_{h1} および w_{h2} として, 分離度 (Rs) は以下の計算式を用いて算出した.

$$Rs = 1.18 \times (t_2 - t_1) / (w_{h1} + w_{h2})$$

(a) D-Ile(D-*allo*-Ile)/D-Leu, (b) D-Leu/L-*allo*-Ile, (c) L-*all*-Ile/L-Ile, (d) L-Ile/L-Leu

Gly (鏡像体無し) および Pro (第二級アミン) を除き, 各鏡像体は完全分離 (分離度は 1.5 以上)

最も保持時間が遅かったのは L-Lys (40°C で分析した場合は 12.9 分)

2-4-3. ピーク強度の向上

LC-MS 分析において移動相の有機溶媒比率が上がると, 質量分析計のイオン源内での効率的なスプレーと脱溶媒が可能になるため, 検出感度の上昇が期待できる. 本研究でも逆相モードから HILIC モードに変更したことにより, ピーク面積の増加が認め

られた。そこで ACN=50% (流速 0.4 mL/min, カラム温度 30°C) 条件下で分析した時のピーク面積を 1 とし, ACN 比率と各アミノ酸のピーク面積の関係を図 2-9 に示した。その結果, ACN=94% 以上では全てのアミノ酸において面積が 10 倍以上になった。

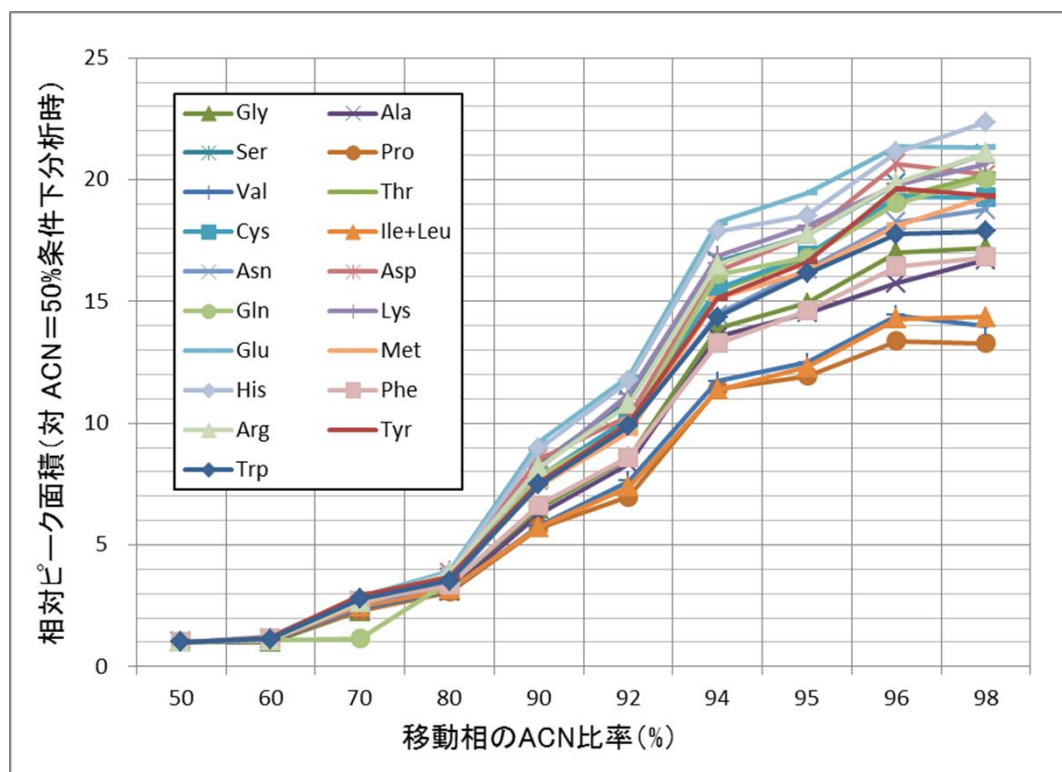


図 2-9. 移動相の ACN 比率とピーク強度(面積)の関係

相対ピーク面積は, 移動相の ACN 比率が 50% の条件下で分析した時のピーク面積比を 1 とした。なお, 各アミノ酸は鏡像体のピーク面積を合算して, 相対比を算出した (Ile と Leu に関しては, 両アミノ酸のすべての鏡像体のピーク面積を合算)。

ACN 比率が 94% 以上では, すべてのアミノ酸の相対ピーク面積は 10 倍以上に増加。

2-4-4. 分離メカニズムの考察

ここまでの実験結果で示したように, カラムの特性上分離不可である Pro (第二級アミン) を除くアミノ酸の鏡像体分離を達成することができた。そこで「本学位論文に關与する原著論文」の中では議論していなかったが, ①キラルセクターの立体構造と, アミノ基以外の官能基の配置, ②保持に寄与する側鎖の構造, ③HILIC の効果, の 3 点に着目し, 分離メカニズムに関する考察を行った。

2-4-4-1. キラルセレクトターの立体構造と、アミノ基以外の官能基の配置

CROWNPAK CR-I のキラルセレクトターは 18-crown-6 の構造を有している。この構造とは少し異なるが、Knoblerら (25) とCramら (26) は、図2-10に示した 18-crown-6 構造を有する Host と Guest (Phenylglycine またはそのメチルエステル) の結晶を作り、X-線結晶解析や分子軌道計算、あるいは NMR 測定により結合様式を解析している。

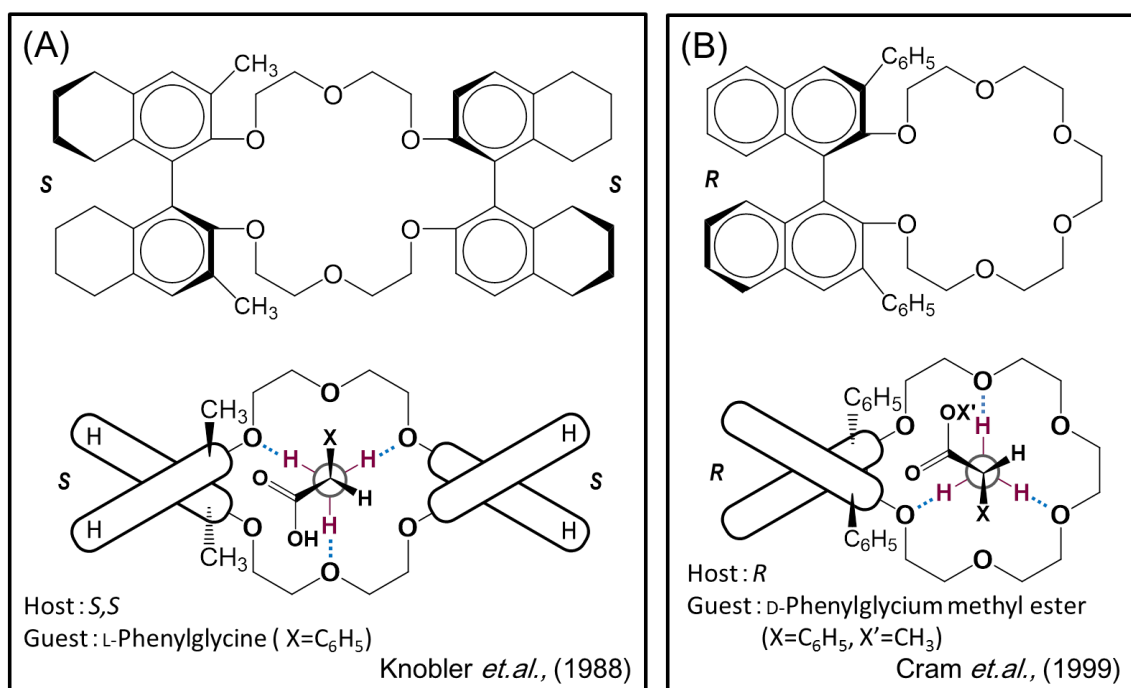


図2-10. 18-crown-6構造を有するHostと、Guest (Phenylglycine または Phenylglycine methyl ester) の立体配置の模式図 (25,26)

(A) Host (*S,S*)と Guest (L-Phenylglycine) の結晶から、Guest のカルボン酸と側鎖(X)、水素原子の立体配置を推定。(B) Host (*R*)と Guest (D-Phenylglycine methyl ester) の結晶から、Guest のカルボン酸エステルと側鎖(X)、水素原子の立体配置を推定。(A)の Host は *S,S*-体、(B)の Host は *R*-体であるため、Guest (アミノ酸)の「COOX', X, H」の位置関係は上下逆転している。

Knoblerらは *S,S*-体の Host と L-アミノ酸の Guest を使い、Cramらは *R*-体の Host と D-アミノ酸メチルエステルの Guest を用いている。よって、アミノ酸の「COOX', X, H」と Binaphthyl の位置関係は、両模式図で上下逆転しているが、Cram の Host も *S*-体であれば、位置関係は同じになり、その Host は CROWNPAK CR-I(-)と同じである。

また、長田は(+)-18-crown-6-tetracarboxylic acid ((+)-18C6H₄) 構造を有するキラルセレクターを用い、お椀(Bowl-like shape) 模型を提唱して、アミノ酸の光学認識機構を解析している(図 2-11)(27).

そこでこれら Host の構造類似性から、CROWNPAK CR-I でも同様の包接が生じていると仮定し、図 2-10 を参考にして Host(CROWNPAK CR-I(+)) のキラルセレクター) と Guest(L-アミノ酸) の模式図を作成した(図 2-12). 図では、Host に大中小 3 つの窪みが形成され、L-アミノ酸の α 位不斉炭素原子に結合しているアミノ基(NH₃⁺)は図の奥側に位置し、カルボキシル基(COOH)、側鎖(R)および水素原子(H)が、それぞれ Host の大中小の窪みに納まっていると仮定した(3点窪み仮説).

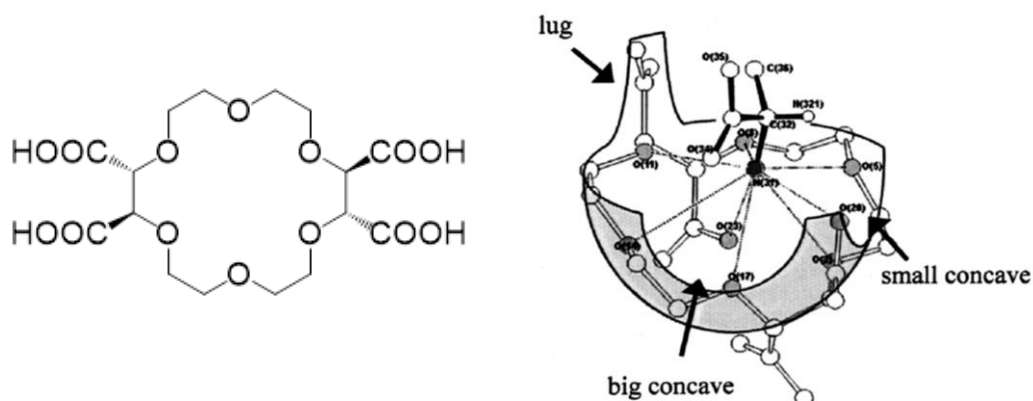


図 2-11. (+)-18-crown-6-tetracarboxylic acid ((+)-18C6H₄) の構造式(左)と、アミノ酸との光学認識機構の概念図(右).

2つの窪みと1つの突起で不斉を認識。(文献 27 より許可を得て転載)

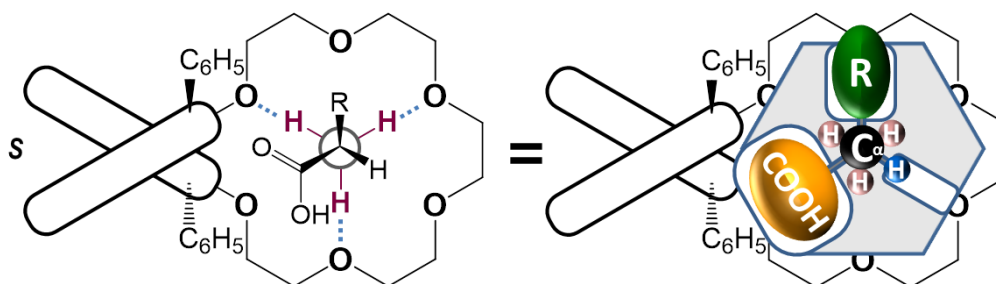


図 2-12. CROWNPAK CR-I(+))カラムのキラルセレクターの L-アミノ酸包接模式図
大中小 3 つの窪みにアミノ酸のカルボキシル基、側鎖 R、水素原子が納まると仮定(3点窪み仮説)

2-4-4-2. 保持に寄与する側鎖の構造

脂肪族アミノ酸に分類される4種類のアミノ酸(L-Ala, L-Val, L-Ile および L-Leu)の β 位炭素原子周辺の構造とカラムへの保持の関係を図 2-13 に示した. なお, CLogP 値は構造式作画ソフト「ChemBioDraw」を用いて計算した.

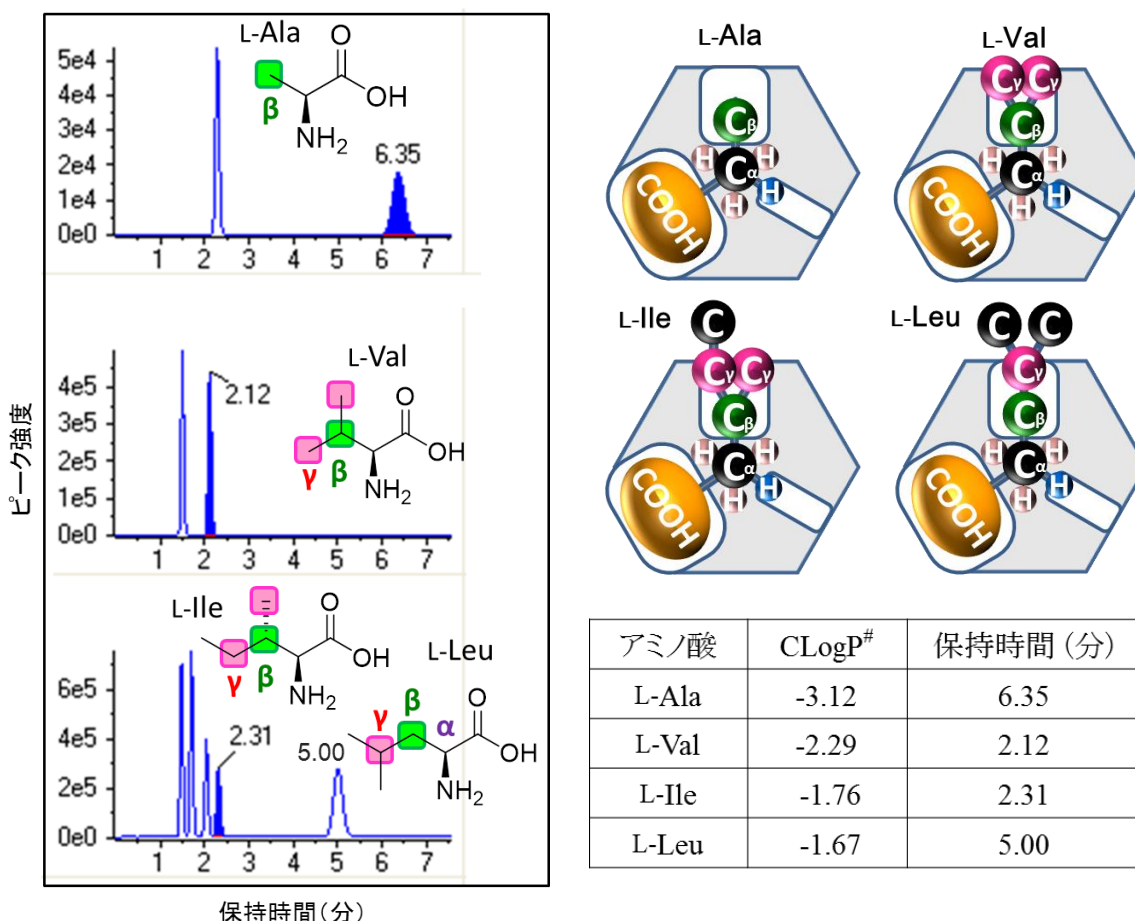


図 2-13. 脂肪族アミノ酸(L-Ala, L-Val, L-Ile および L-Leu)の β 位炭素原子周辺の構造とカラムへの保持の関係

LC-MS クロマトグラムの移動相条件: ACN/Water/TFA = 96/4/0.5, カラム: CR-I(+), カラム温度: 30°C

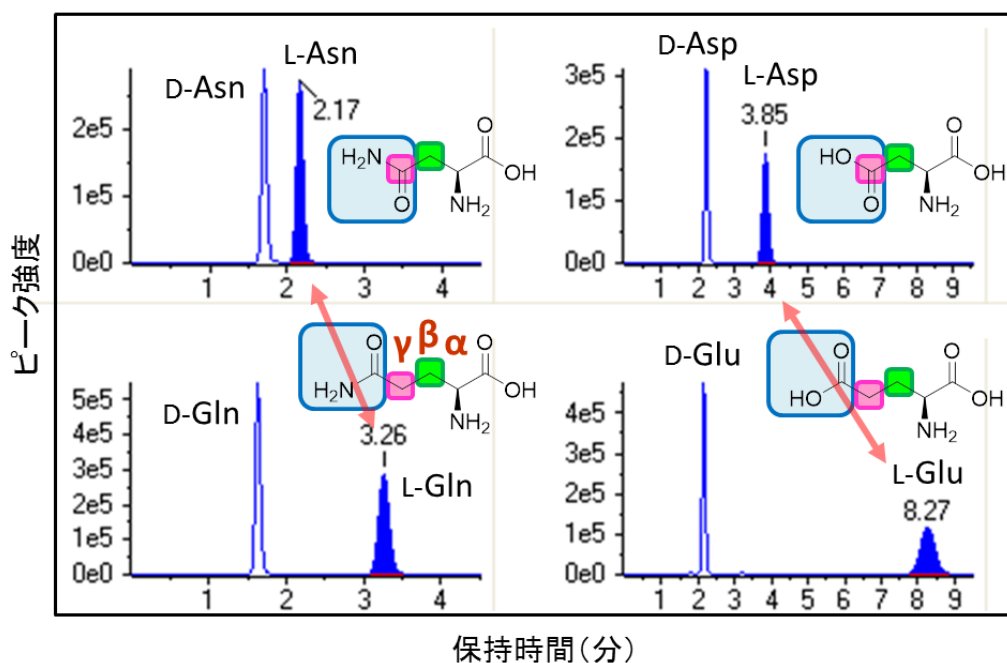
#: CLogP は「ChemBioDraw」を用いて計算

β 位炭素原子の周辺が嵩高いと, カラムへの保持が弱くなる(保持時間は短くなる).

図 2-13 では, β 位炭素原子を緑色, γ 位炭素原子をピンク色で塗り分けている.

L-Leu は L-Val より「-CH₂-」が一つ多く, CLogP が大きい(疎水性)にもかかわらず, 保持時間は L-Val より大幅に遅くなっていた. これは 1-4 項で説明した「HILIC モードで

は親水性化合物よりも疎水性化合物のほうが保持は弱い(早く溶出される)」という説明と矛盾した結果である。また、L-Ile の CLogP 値は L-Leu と近いが、保持時間はむしろ L-Val と近かった。そこで、これら3化合物の構造式を比較したところ、Val と Ile では緑色のβ位炭素原子にピンク色の炭素原子が二つ結合しているが、Leu では一つしか結合していない。そして図 2-13 右上の模式図から、Val と Ile ではβ位炭素原子の周辺が嵩高いため、中サイズの窪みに納まることができず、その結果 Host との相互作用が弱まり保持時間が短くなったと推定した。



アミノ酸	CLogP [#]	保持時間(分)	
		D-体	L-体
Asn	-3.54	1.70	2.17
Gln	-3.37	1.63	3.26
Asp	-2.41	2.23	3.85
Glu	-2.69	2.16	8.27

図 2-14. Asn と Gln および Asp と Glu の β 位炭素原子周辺の構造とカラムへの保持の関係

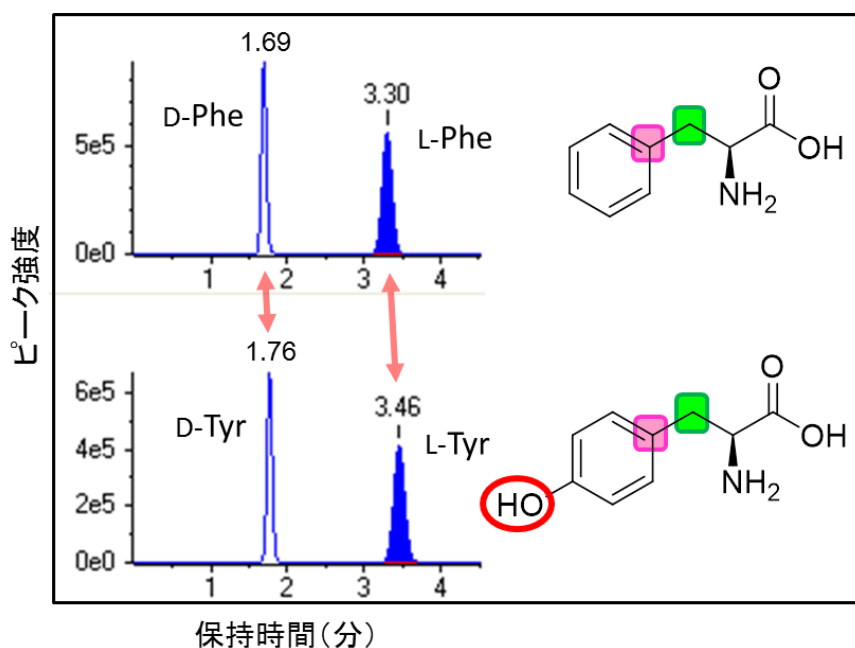
LC-MS クロマトグラムの移動相条件: ACN/Water/TFA = 96/4/0.5, カラム:CR-I(+), カラム温度:30°C

#: CLogP は「ChemBioDraw」を用いて計算

β 位炭素原子の周辺が嵩高い L-Asn と L-Asp は、L-Gln または L-Glu に比べカラムへの保持が弱い。

ならば、このような現象が他のアミノ酸でも生じているのかを確認するため、L-Asn と L-Gln、および L-Asp と L-Glu の二つの組合せでも確認した(図 2-14)。Gln と Glu の β 位炭素原子の隣は共に「-CH₂-」であるのに対し、Asn と Asp ではそれぞれ「-CONH₂」および「-COOH」という嵩高い構造になっている。よってこの嵩高さの違いが、図 2-13 の脂肪族アミノ酸と同じく、L-Gln または L-Glu に比べ L-Asn と L-Asp の保持時間が短くなっている要因だと推定した。

また、Phe と Tyr はどちらも β 位炭素原子にベンゼン環が結合しており、Tyr にのみ存在するベンゼン環の水酸基は β 位炭素原子から大きく離れているため、両者の保持時間には大きな差が生じなかったと考えられる(図 2-15)。



アミノ酸	CLogP [#]	保持時間(分)	
		D-体	L-体
Phe	-1.56	1.69	3.30
Tyr	-2.22	1.76	3.46
Lys	-3.42	3.72	12.92

図 2-15. Phe と Tyr の構造とカラムへの保持の関係

LC-MS クロマトグラムの移動相条件: ACN/Water/TFA = 96/4/0.5, カラム: CR-I(+), カラム温度: 30°C

#: CLogP は「ChemBioDraw」を用いて計算

Tyr のベンゼン環の水酸基は β 位炭素原子から大きく離れており、カラム保持への影響は小さい。

最後に Lys であるが、他のアミノ酸に比べ D-体、L-体とも保持は強く(保持時間は 3.7 分および 12.9 分)、中でも L-Lys の保持時間は全アミノ酸の中で最も遅かった。Lys には α 位の他に、 ϵ 位の炭素原子にもアミノ基が結合している。よって、これら二つのアミノ基がクラウンエーテルの酸素原子と水素結合(包接)することにより保持が強くなっていると推定した。

2-4-4-3. HILIC の効果

長田の概念図(図 2-11)において包接されているアミノ酸は D-体である。(+)-18C6H₄ では CROWNPAK CR-I(+) とは逆に、D-体のほうが L-体より保持が強い(β 位炭素原子に水酸基が結合している Ser と Thr は例外)。その理由として D-体の側鎖は小さな窪み (small concave) 側に配置されているのに対し、L-体の側鎖は突起 (lug) 側に配置されるためと推定している(図 2-16)。

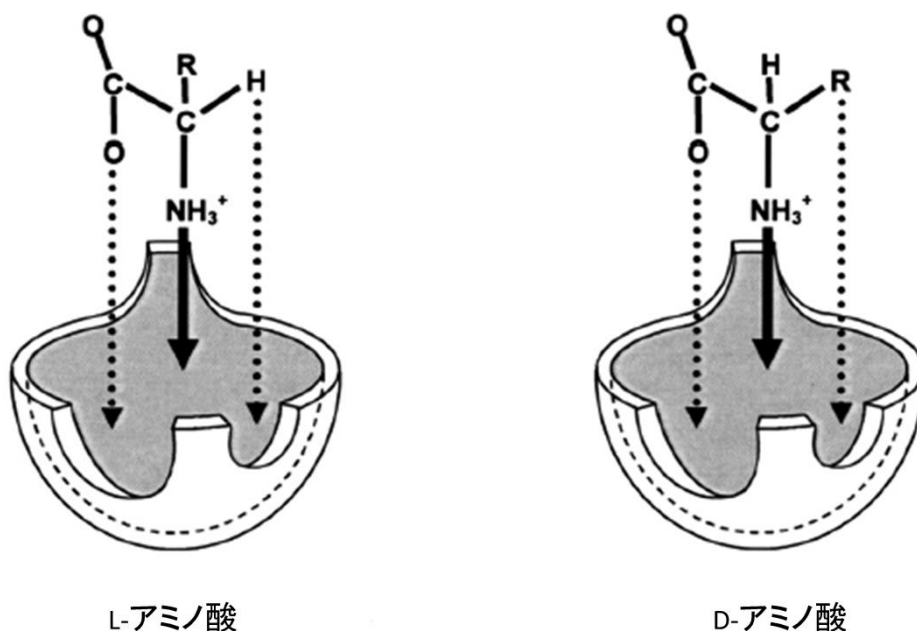


図 2-16 キラルセレクトーのコンフォメーションとアミノ酸の模式図

(+)-18-crown-6-tetracarboxylic acid ((+)-18C6H₄) の場合、側鎖 R が small concave 側に配置される D-アミノ酸のほうが、お椀 (bowl-like shape) に納まり易い。(文献 27 より許可を得て転載)

そこで、この考えを CROWNPAK CR-I にも応用し、HILIC モードにおける現象解明にまで発展させることにした(図 2-17). 逆相モードでも D-体と L-体の間には、固定相との相互作用(ピンク色↓)に小さな差が存在している. そして、HILIC モードに変わることによって固定相に近づく作用(青色↓)は両鏡像体とも同じ強さで増強されるものの、立体障害によるマイナスの効果(緑色↑)は D-体のほうが強く現れる. その結果、相互作用(カラムへの保持)の差は逆相モードの場合より大きくなると考えられる. これにより、鏡像体分離が改善されていったと推定した.

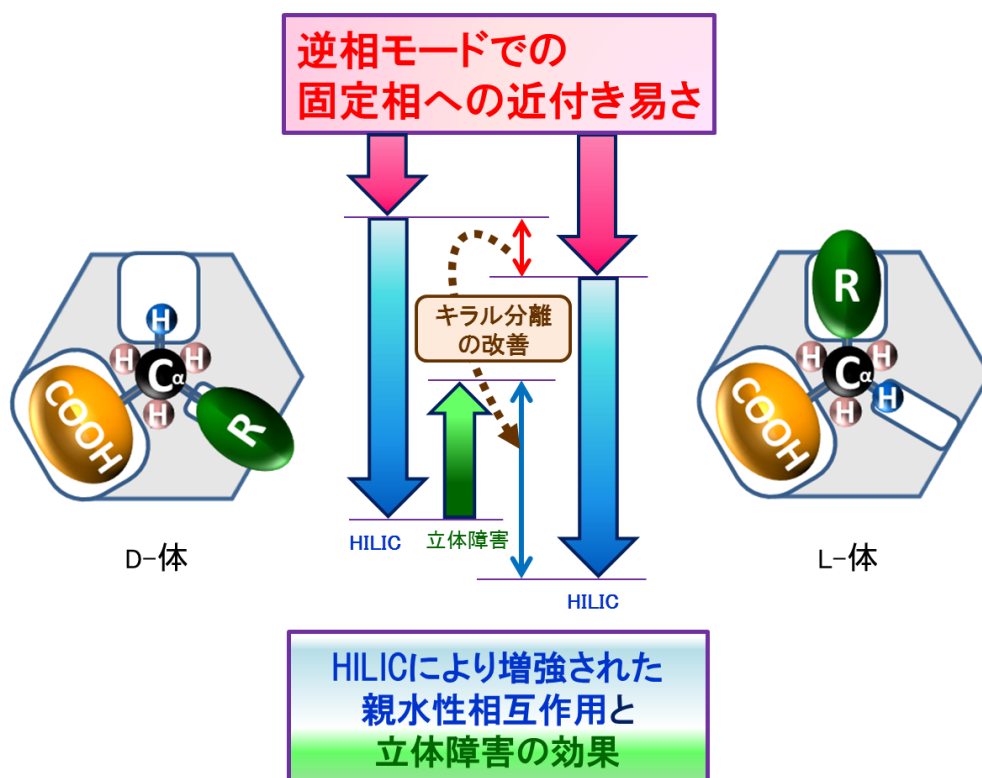


図 2-17 CROWNPAK CR-I(+) における HILIC モードでのアミノ酸包接の模式図
逆相モードから HILIC モードに変わることにより、固定相との相互作用(青色↓)は両鏡像体とも同じ強さで増強される. しかし立体障害によるマイナスの効果(緑色↑)は D-体のほうが強く現れるため、両者の相互作用(カラムへの保持)の差は広まると推定.

以上、Knobler, Cram および長田らの文献を参考に「3点窪み仮説」を提唱し、分離メカニズムの考察を行った. HostとGuestの状態は、結晶と液体(LC移動相)中の間で

も異なり, さらに液体中では Host 自体が様々なコンフォメーションをとることができる. よって, 持ち合わせのデータだけでは推測の域を出ることはできないが, β 位炭素原子周辺の嵩高さの違いがアミノ酸の保持に大きく関与しているという仮説は, 本研究の実験データを用いて確認した範囲内では強く支持された. この考察は一斉分析法を確立したことにより, 初めて可能となったものである. また, 過去の報告には逆相と HILIC の両モードでのキラル分離を比較した例はなく, 本研究によって新たな知見が生み出されたと言える.

2-5. 小括

逆相モードでの分析では良好な結果は得られなかったものの, 移動相の ACN 比率を上げて HILIC モードで分析することにより, 鏡像体分離は劇的に改善した. 第一章では既存の分析法のほぼ最高レベルである「グラジエント条件で分析時間 30 分以内に 15 種類以上のアミノ酸鏡像体を分離」という目標を掲げたが, 鏡像体分離能とピーク形状の改善は予想をはるかに超えていたため, 「非誘導体化法でありながら, 分析時間 15 分のアイソクラティック条件で, Gly と Pro を除く 18 種類のアミノ酸鏡像体を完全分離する分析法」を開発することができた.

また, 移動相中の有機溶媒比率が増したことにより, ピーク強度は逆相モードより 10 倍以上向上した.

さらに, アミノ酸側鎖の違いや HILIC モードによる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, この仮説は強く支持された.

第三章 食品中 D-アミノ酸の定量(実サンプルへの応用)

3-1. 緒言

第二章の実験で用いた標準液とは異なり、食品や生体試料中のアミノ酸を分析するには、装置への汚染やイオン化抑制などを防ぐためにサンプルの前処理が必要となる。また、サンプル前処理後の最終溶解液の組成と移動相の組成の違いがピーク形状に大きな影響を与えることもある。

そこで本章では、①実サンプル分析のための前処理条件と移動相組成の最適化、②検量線のバリデーション、③実サンプルを用いた定量法の実用性について述べる。特に実用性に関しては、市販の食品(黒酢, キムチ, ヨーグルト)中 D-アミノ酸を定量するだけでなく、他施設が定量した黒酢中 D-アミノ酸の報告値との比較も行った。

3-2. 実験方法

3-2-1. 試薬

2-3-1 項に記載した試薬に加え、Ethanol for HPLC (EtOH) は和光純薬工業から、Chloroform for HPLC はキシダ化学(大阪, 日本)から、DL-Alanine-2,3,3,3-d₄ (d₄-DL-Ala) は Santa Cruz Biotechnology (テキサス, 米国) から購入した。

3-2-2. マトリックス(食品サンプル)

定量法のバリデーション用マトリックス(牛乳, 穀物酢), および食品中 D-アミノ酸定量用サンプル(黒酢, キムチ, ヨーグルト)は, 表 3-1 に記したものを使用した。

表 3-1. 食品サンプル

分類	商品(略語)	製造元または購入先
牛乳	牛乳(成分無調整) (Milk)	雪印メグミルク (東京, 日本)
穀物酢	穀物酢 (Vinegar)	ミツカン (愛知, 日本)
黒酢	純玄米黒酢 (AEON)	イオン (千葉, 日本)
	純玄米黒酢 (Mizkan)	ミツカン
	玄米黒酢 (JHS)	日本ヘルスシステム (東京, 日本).
キムチ	甘口キムチ (Amakuchi)	グリーンファーム (大阪, 日本)
	イチオシキムチ (Ichioshi)	美山 (千葉, 日本)
	ご飯がススム (GS)	ピクルスコーポレーション (埼玉, 日本)
ヨーグルト	ビフィズス菌 SP 株カプセルヨーグルト ドリンクタイプ (Bifidus)	雪印メグミルク
	ガセリ菌 SP 株ヨーグルト ドリンクタイプ (Gasseri)	雪印メグミルク
	のむヨーグルト LB81 プレーン (LB81)	明治 (東京, 日本).

3-2-3. 検量線用アミノ酸混合標準溶液の調製 (DL-20mix calibration standard solutions)

2-3-2 項で調製したアミノ酸混合標準液 1000 nmol/mL (DL-20mix-1000) を, 50%MeOH-0.01 mol/L-HCl を用いて段階希釈し, 最終的に「1000, 400, 100, 40, 10, 4 and 1 nmol/mL in 50%MeOH-0.01 mol/L-HCl (DL-20mix calibration standard solutions)」を調製した. なお, これら標準液中のアミノ酸濃度は D/L-アミノ酸を合計した濃度であり, D-アミノ酸または L-アミノ酸としては, それぞれ半分 (D-Ile, L-Ile および D-allo-Ile, L-allo-Ile では 4 分の 1) の濃度となる.

3-2-4. 内部標準物質標準液の調製 (IS-solution)

DL-Alanine-2,3,3,3-d₄ を 50%MeOH に溶解し, 40 μmol/mL 標準液を調製した (IS-solution).

3-2-5. 検量線サンプルの前処理

前処理は液液抽出法 (LLEA: Liquid-Liquid Extraction method for Amines) (図 3-1) に従い実施した. その概略を説明すると, マトリックス(超純水 (Water), 牛乳 (Milk), または穀物酢 (Vinegar)) (50 μ L) を超純水 (50 μ L) で 2 倍希釈し, DL-20mix calibration standard solutions (0 ~ 1000 nmol/mL in 50%MeOH-0.01 mol/L-HCl) (100 μ L), MeOH (300 μ L) および IS-solution (20 μ L) をそれぞれ添加し, ボルテックスミキサーを用いて攪拌後, 遠心した (16,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 分). 得られた上清 (360 μ L) に超純水 (180 μ L) と Chloroform (360 μ L) を混合し, ボルテックスミキサーを用いて攪拌後, 遠心した (16,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 分). 上下に分かれた二層の上層 (50 μ L) に希釈液 (ACN/EtOH = 8/2 (v/v), 200 μ L) (希釈方法の検討では ACN/EtOH = 10/0, 9/1 (v/v) や液量 150 μ L の場合もあり) を混合し, ボルテックスミキサーを用いて攪拌後, 遠心した (16,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 分). その上清 1 μ L を LC-TOFMS に注入し, 分析した.

3-2-6. 黒酢およびヨーグルトの前処理

黒酢およびヨーグルトの前処理は, 3-2-5 項の検量線サンプル 0 nmol/mL と同じ方法を用いて実施した. すなわち, マトリックスとして黒酢またはヨーグルト (50 μ L) を用い, DL-20mix calibration standard solutions の代わりに 50%MeOH-0.01 mol/L-HCl (100 μ L) を用いて行った.

3-2-7. キムチの前処理

キムチの中から白菜 (約 1 g) を取り出し, 表面に付着している漬汁等を超純水で軽く洗い流した. 次に, 白菜の表面の水分をキムワイプで拭き取り, 薬匙で押し潰した後, 遠心した (16,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 分). 得られた上清は, 3-2-6 項の黒酢やヨーグルトと同様の方法で前処理した.

①	サンプル / 超純水 (Water) = 1/1	100 μ L
	50% MeOH-0.01 mol/mL-HCl	
	or DL-20mix calibration standard solution	100 μ L
	IS-solution (d ₄ -DL-Ala 40 μ mol/mL in 50% MeOH)	20 μ L
	MeOH	300 μ L
	↓	
	ボルテックス, 遠心分離 (16000 x g, 4°C, 10 分)	
	↓	
②	上清	360 μ L
	超純水	180 μ L
	Chloroform	360 μ L
	↓	
	ボルテックス, 遠心分離 (16000 x g, 4°C, 10 分)	
	↓	
③	上層	50 μ L
	ACN/EtOH = 8/2 (or 10/0, 9/1 (v/v)) ^a	200 μ L (150 μ L) ^b
	↓	
	ボルテックス, 遠心分離 (16000 x g, 4°C, 10 分)	
	↓	
	上清 1 μ L-注入 (LC-TOFMS 分析)	

図 3-1. 抽出法の概略 (LLEA: Liquid-Liquid Extraction method for Amines)

①タンパク変性, ②脂質除去, ③最終希釈

a, b : 「10/0, 9/1 (v/v)」と「150 μ L」は条件検討時のみ

3-2-8. 回収率検討用サンプルの前処理

回収率検討用サンプルの前処理は, 3-2-5 項の検量線サンプルの 1000 nmol/mL と同じ方法を用いて実施した. すなわち, マトリックスとして各食品サンプル (50 μ L), calibration standard solutions として DL-20mix-1000 (100 μ L) を用いた.

3-2-9. 分析

2-2-3 項と同じシステムを用い、移動相の組成を変更しながら LC は表 3-2, TOFMS は表 2-3-2 の条件を用いて分析を行った。検量線サンプル、食品サンプルの抽出液、またはアミノ酸およびアミン類の混合標準液 1 μ L を LC-TOFMS に注入して分析した。カラムは基本的に CROWNPAK CR-I(+) を使用したが、D/L-アミノ酸の面積比の検討ならびに食品中 D-allo-Ile の確認には、CROWNPAK CR-I(-) カラムも使用した。

表 3-2. LC 分析条件 (Nexera system)

カラム	CROWNPAK CR-I(+) or CR-I(-) (3.0 mm i.d. \times 150 mm, and 5 μ m particle size)
移動相	ACN/EtOH/Water/TFA = 96/0/4/0.5 or 95/0/5/0.5 ~ 80/15/5/0.5 (v/v/v/v)
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	30
流速 (mL/min)	0.4
オートサンプラー温度 ($^{\circ}$ C)	4
サンプル注入量 (μ L)	1

3-2-10. 回収率の計算

食品サンプルからの D-アミノ酸回収率 (Gly と Pro は除く) は、回収率検討用食品サンプル (1000 nmol/mL in 食品) の D-アミノ酸/IS ピーク面積比を、水の検量線サンプル (1000 nmol/mL in Water) の D-アミノ酸/IS ピーク面積比で除して算出した。なお、食品中に内因性 D-アミノ酸が存在している場合は、別途ブランクサンプルを用いてピーク面積比を算出し、その数値を差し引いてから回収率を算出した。

3-2-11. D-アミノ酸濃度の算出

回帰曲線 ($Y = aX + b$; 重み付け $1/X^2$) は、解析ソフト MultiQuant (AB SCIEX) を用いて最小二乗法により算出した。この式において「D-アミノ酸 / IS のピーク面積比」を Y , 「マトリックスへの添加濃度」を X , 係数を a, b とした。食品中 D-アミノ酸濃度は、まず水の検量線サンプルから得られた回帰式で濃度を算出し、その濃度をさらに食品の種類ごとに得られた各 D-アミノ酸の回収率で除した数値を定量値とした。

3-2-12. 標準液中 D/L-アミノ酸のピーク面積比

アミノ酸混合標準液 (DL-20mix-1000) を、移動相 (ACN/EtOH/Water/TFA = 80/15/5/0.5 (v/v/v/v)) で 100 倍および 1000 倍に希釈 (DL-20mix 10 および 1 nmol/mL in 移動相) して分析し、D/L-アミノ酸のピーク面積比を算出した。

3-3. 結果と考察

3-3-1. 移動相組成の最適化

3-1 項でも述べたように、食品サンプル抽出後の最終溶液 (サンプル最終溶液) と移動相の組成は通常異なる。そして第二章で確定した移動相組成「ACN/Water/TFA = 96/4/0.5 (v/v/v)」を用いてサンプル最終溶液を分析したところ、数種類のアミノ酸においてピーク形状の不良が観察された。そこで、ピーク形状改善のためにサンプル最終溶液と移動相の組成が近くなるように、両者を調整しながら最適化を行った。一例として、標準液の抽出処理の最終希釈を ACN で行い、異なる移動相組成で分析した際の Arg のクロマトグラムを、図 3-2 に示した。

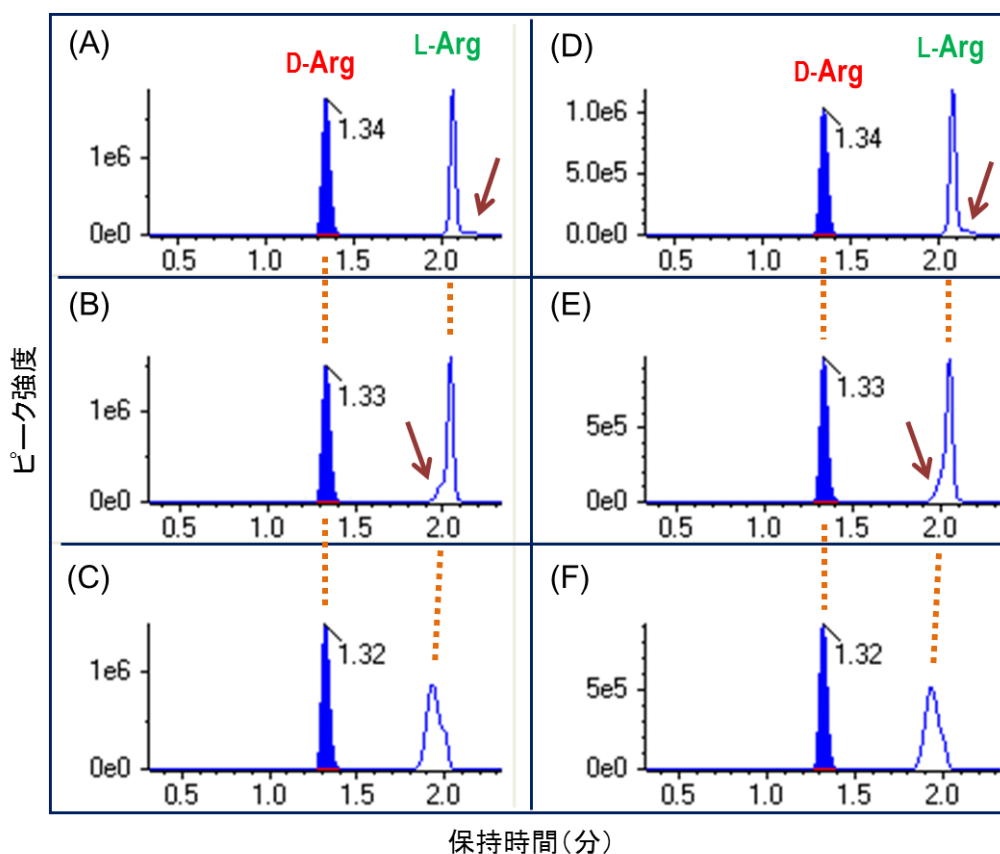


図 3-2. 移動相組成とサンプルの希釈方法の違いによる Arg のピーク形状の変化
抽出処理の最終希釈は ACN で (A, B, C) 4 倍希釈, または (D, E, F) 5 倍希釈して分析。

移動相条件: ACN/EtOH/Water/TFA = (A, D) 85/10/5/0.5, (B, E) 83/12/5/0.5, (C, F) 80/15/5/0.5.

カラム: CR-I(+), カラム温度: 30°C.

矢印で示したように, 移動相組成とサンプル希釈液の組成の相性が悪い場合, L-Arg のピークが, (A, D)ではテーリング, (B, E)ではリーディングした。

様々な組合せを検討した結果, 最終的な移動相組成は「ACN/EtOH/Water/TFA = 80/15/5/0.5 (v/v/v/v)」, 希釈液と希釈倍率は「ACN/EtOH = 8/2(v/v)で 5 倍希釈」を採択することにした。この条件における分析時間は 10 分以内 (最も溶出が遅かった L-Lys の保持時間は 7.6 分) で, 第二章の約 15 分よりもさらに短くなったが, 18 種類のタンパク質構成アミノ酸の鏡像体は良好な分離 ($R_s \geq 1.5$) を維持していた (図 3-3 (A))。また, 同じ移動相で CR-I(-)カラムに置き換えた分析でも, D/L-アミノ酸の溶出順を反転させたまま良好な分離を示した (図 3-3 (B))。

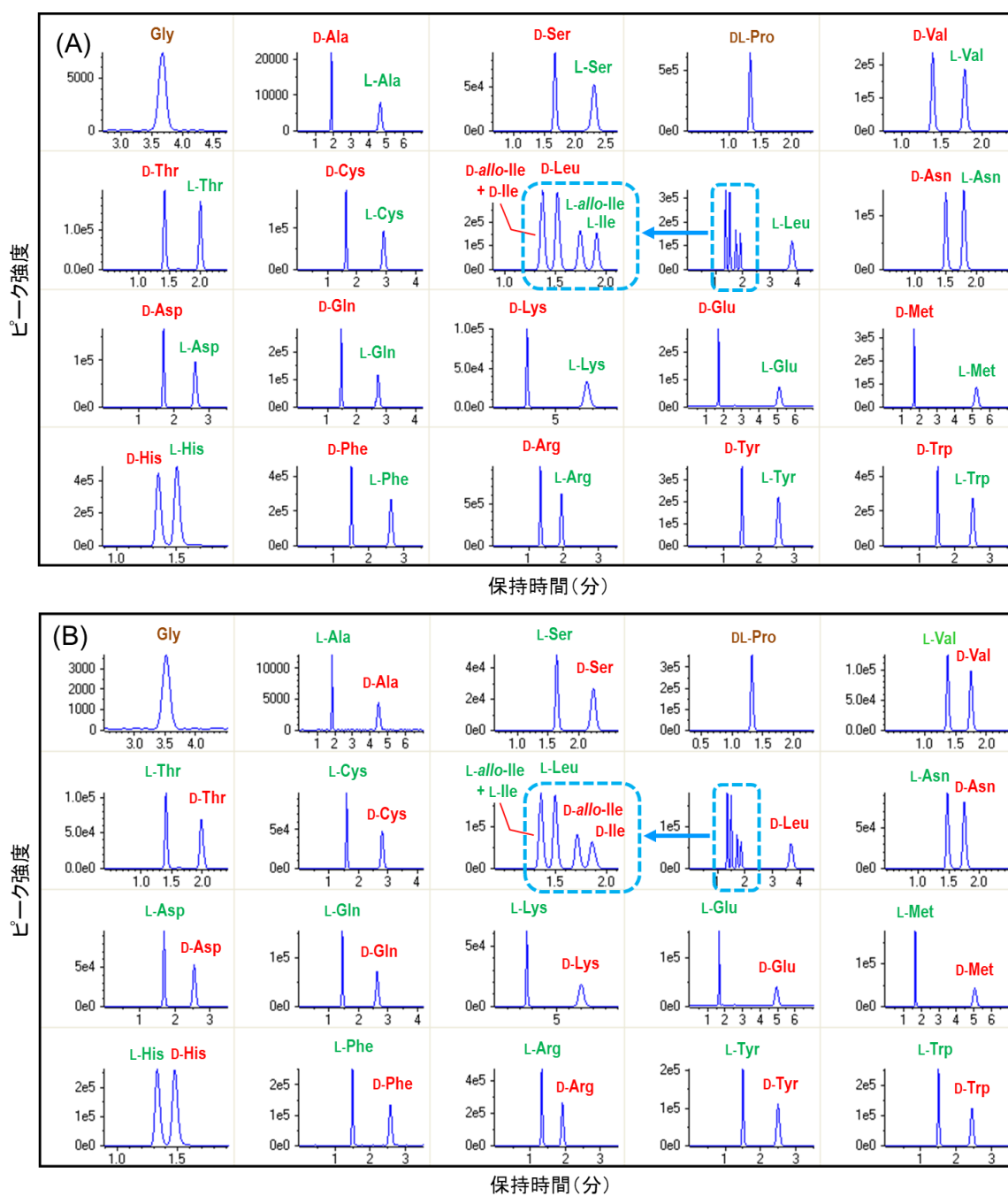


図 3-3. CROWNPAK CR-I(+)/(-)カラムの性能比較

タンパク質構成アミノ酸鏡像体混合標準液を分析. 分析カラム: (A) CR-I(+), (B) CR-I(-).

移動相条件: ACN/EtOH/Water/TFA = 80/15/5/0.5, カラム温度: 30°C.

D/L-アミノ酸の溶出順が反転したまま, どちらも良好な分離を示した.

3-3-2. D/L-アミノ酸のピーク面積比

検出器として質量分析計を用いている既存の分析法では, グラジエント条件を採用

している. そのため一回の分析中に移動相組成が変化し, それに伴い化合物のイオン化効率は大きく影響を受ける. よって, 検出された D/L-アミノ酸のピーク面積比だけで実際の存在比を推定することはできない. 一方, 我々の分析法ではアイソクラティック条件を用いており, カラムからの溶出液(移動相)の組成は基本的に分析期間中一定なので, イオン化効率もほぼ一定になっていると推察される. 本法を用いてアミノ酸標準液(DL-20mix 1 and 10 nmol/mL in 移動相)を CR-I(+)と CR-I(-)の両カラムで分析したところ, 全アミノ酸の D/L-体の面積比はほぼ 1.0(0.87~1.10)であった(表 3-3).

表 3-3. アミノ酸標準液(DL-20mix 1 and 10 nmol/mL)の D/L-アミノ酸のピーク面積比 (CR-I(+)および CR-I(-)カラムで分析)

アミノ酸	CR-I(+)		CR-I(-)	
	1 nmol/mL	10 nmol/mL	1 nmol/mL	10 nmol/mL
Ala	0.95	0.95	1.10	1.06
Ser	1.00	0.97	1.00	1.03
Val	1.02	0.99	1.03	1.01
Thr	1.00	1.00	0.96	0.97
Cys	0.98	0.97	1.01	1.04
Ile + <i>allo</i> -Ile ^a	0.99	0.97	1.00	1.02
Leu	0.99	0.92	1.02	1.08
Asn	0.99	0.87	0.98	1.09
Asp	0.99	0.99	1.00	1.02
Gln	0.96	1.03	1.05	1.00
Lys	1.00	0.95	1.04	1.03
Glu	0.96	1.00	1.08	1.03
Met	1.00	0.98	1.02	1.03
His	0.99	0.92	1.00	1.10
Phe	0.98	0.91	0.97	1.05
Arg	1.06	1.06	0.93	0.93
Tyr	1.00	0.91	1.01	1.09
Trp	0.95	0.90	0.93	1.00

a : [(D-Ile の面積) + (D-*allo*-Ile の面積)] / [(L-Ile の面積) + (L-*allo*-Ile の面積)]

どちらのカラムで分析しても, D/L-体の面積比はほぼ 1.0 (0.87 ~ 1.10).

3-3-3. 定量法のバリデーション

D-アミノ酸定量法の妥当性を確認するため検量線を作成し、回収率、定量限界、直線性、真度と精度を評価した(表 3-4, 付録 3-1, 3-3). 分析には CR-I(+)カラムを用いた. D-アミノ酸の回収率は、牛乳と穀物酢で 72.1 % 以上、および 89.9 % 以上だった. 定量限界(LOQ)は「真度が 80 - 120 %, 精度が 20 % 以内で、それ以外の濃度では真度が 85 - 115 %, 精度が 15 % 以内となる最低濃度」に設定した.

表 3-4. 検量線のバリデーションの要約

マトリックス アミノ酸	検量線				回収率			
	水(超純水)				牛乳		穀物酢	
	r ^a	LOD ^b	LLOQ ^c	ULOQ ^d	平均 ^e	RSD ^f	平均 ^e	RSD ^f
D-Ala	0.997	10	10	1000	101.5	1.2	103.5	1.7
D-Ser	0.992	4	4	1000	99.9	3.2	95.3	2.6
D-Val	0.997	4	4	1000	102.5	3.0	98.7	2.1
D-Thr	0.993	1	4	1000	99.6	2.9	93.5	2.7
D-Cys	0.998	4	4	1000	94.9	4.1	90.7	2.5
D-Ile + D-allo-Ile	0.998	4	4	1000	98.8	2.1	98.4	3.0
D-Leu	0.996	1	4	1000	101.9	3.1	100.1	1.7
D-Asn	0.995	4	4	1000	97.8	4.4	94.0	2.4
D-Asp	0.996	4	4	1000	85.4	3.4	95.8	2.1
D-Gln	0.998	4	4	1000	99.8	4.3	89.9	2.4
D-Lys	0.998	40	40	1000	72.1	6.6	107.3	2.4
D-Glu	0.996	4	4	1000	97.0	2.8	93.9	2.2
D-Met	0.998	4	4	1000	100.9	3.0	95.5	1.6
D-His	0.994	4	4	1000	85.7	3.0	94.1	3.7
D-Phe	0.990	1	4	1000	101.4	2.7	98.3	2.2
D-Arg	0.992	1	4	1000	79.8	4.6	93.8	4.4
D-Tyr	0.994	1	1	1000	100.6	3.5	96.1	1.6
D-Trp	0.997	1	1	1000	99.9	2.6	93.9	1.7

a: 相関係数(Correlation coefficient), b: 検出限界(Limit of Detection) (nmol/mL), c: 定量下限(Lower Limit of Quantification) (nmol/mL), d: 定量上限(Upper Limit of Quantification) (nmol/mL), e: 平均(Average of Accuracy (n=3)) (%), f: 相対標準偏差(Relative Standard Deviation) (%).
 良好な直線性(r 値)と高い回収率(Recovery rate:ほとんどのアミノ酸で 90%以上)が示された.

3-3-4. 食品中 D-アミノ酸の定量

穀物酢の D-Ala, D-Asp および D-Glu を除き、ブランクの牛乳と穀物酢中の D-アミノ酸は LLOQ 以下だった。市販の黒酢中には 14 種、キムチ中には 10 種、そしてヨーグルト中には 5 種類の D-アミノ酸が検出された(表 3-5, 付録 3-1, 3-2)。

次に、他の 3 施設で定量された黒酢中 D-アミノ酸の報告値との比較を行った。用いた黒酢商品は異なるが、新規分析法では 10~14 種類の D-アミノ酸が検出されており、検出数に関しては他の分析法に比べても遜色ない結果であった(表 3-6)。

表 3-5. 食品中 D-アミノ酸濃度

アミノ酸	(nmol/mL)								
	黒酢			キムチ			ヨーグルト		
	AEON	JHS ^a	ミツカン	甘口	イチオシ	GS ^b	ビフィズス	LB81	ガセリ
D-Ala	372.6	198.1	41.7	175.8	(3208.4) ^f	172.0	49.2	97.5	111.3
D-Ser	24.7	29.5	16.4	7.4	21.2	7.9	trace	4.0	trace
D-Val	36.6								
D-Thr (+ D-allo) ^c	6.6	7.2	7.3	(3.1) ^a	11.0	4.7			
D-Cys									
D-Ile (+ D-allo) ^d	62.8	(2.6) ^e	(3.0) ^e	trace	trace	trace			
D-Leu	93.6	5.9	4.4	5.4	13.2	9.8			
D-Asn	17.0	7.4	16.8						
D-Asp	106.0	42.5	24.7	51.4	120.7	39.8		19.6	trace
D-Gln									
D-Lys				trace	trace				
D-Glu	69.2	37.2	25.4	103.4	138.0	96.8	14.2	32.7	27.2
D-Met	5.7	(1.5) ^e	(1.3) ^e	trace	trace	trace			
D-His	6.3	5.0	7.0	4.4	9.2	6.7			
D-Phe	6.0	7.7	5.1	(2.4) ^e	(3.5) ^e	4.9			
D-Arg	10.7	(3.0) ^{e,f}	5.8	4.5	11.6	4.3	(3.2) ^e	4.7	4.6
D-Tyr	1.9	5.0	3.1	1.3	2.8	1.7			
D-Trp									

a : 日本ヘルスシステム(JHS), b : ご飯がススム(GS), c : D-Thr, D-allo-Thr および D-homoserine を合算, d : D-Ile と D-allo-Ile を合算, e : 定量下限未満, f : 定量上限超.

市販の黒酢中から 14 種, キムチ中から 10 種, ヨーグルト中から 5 種類の D-アミノ酸を検出

表 3-6. 新規分析法の実用性評価(黒酢中 D-アミノ酸測定 of 施設間比較)

アミノ酸	紺屋/福崎				岡田/老川	三次/浜瀬	牟田口/大島
	LLOQ ^a	AEON	JHS ^b	ミツカン	A #17	Local-D	High-brix
D-Ala	10	372.6	198.1	41.7	887.0	846.0	534.4
D-Ser	4	24.7	29.5	16.4	75.2	95.9	431.4
D-Pro	—	N.D. ^c	N.D.	N.D.	39.9	24.5	N.D.
D-Val	4	36.6	N.D.	N.D.	121.1	trace	6.3
D-Thr (+ D- <i>allo</i>) ^c	4	6.6	7.2	7.3	N.D.	trace	N.D.
D-Cys	4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D-Ile (+ D- <i>allo</i>) ^d	4	62.8	(2.6) ^f	(3.0) ^f	2.5	10.5	N.D.
D-Leu	4	93.6	5.9	4.4	10.2	18.1	224.7
D-Asn	4	17.0	7.4	16.8	N.D.	10.4	188.9
D-Asp	4	106.0	42.5	24.7	157.0	282.0	631.3
D-Gln	4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D-Lys	40	N.D.	N.D.	N.D.	7.4	N.D.	N.D.
D-Glu	4	69.2	37.2	25.4	77.7	171.0	241.6
D-Met	4	5.7	(1.5) ^f	(1.3) ^f	N.D.	N.D.	N.D.
D-His	4	6.3	5.0	7	36.9	trace	N.D.
D-Phe	4	6.0	7.7	5.1	4.6	trace	214.9
D-Arg	4	10.7	(3.0) ^f	5.8	6.5	N.D.	93.2
D-Tyr	1	1.9	5.0	3.1	28.1	N.D.	148.3
D-Trp	1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D-アミノ酸検出数		14	10 (3) ^f	11 (2) ^f	13	8 (4) ^f	10

4 施設で用いた黒酢商品は全て異なる。 a : 定量下限 (LLOQ) は紺屋/福崎法を用いた場合にのみ適用,

b : 日本ヘルスシステム (JHS), c : D-Thr, D-*allo*-Thr および D-homoserine を合算,

d : D-Ile と D-*allo*-Ile を合算, e : 検出限界以下 (Not detected), f : 定量下限未満.

新規分析法では 10 種類以上の D-アミノ酸を検出 (他施設と同等レベルの検出数)

また, 第二章において, 逆相モードから HILIC モードに変更することにより検出感度が 10 倍以上向上したことを示した. そこで, 各アミノ酸の定量下限 (LLOQ) に対する定量値の比を求め, 図 3-4 に示した. LLOQ が表 3-6 の数値より 10 倍高いと仮定した場合, 約 8 割の D-アミノ酸は定量下限以下となるため, 高感度化の有効性が示された.

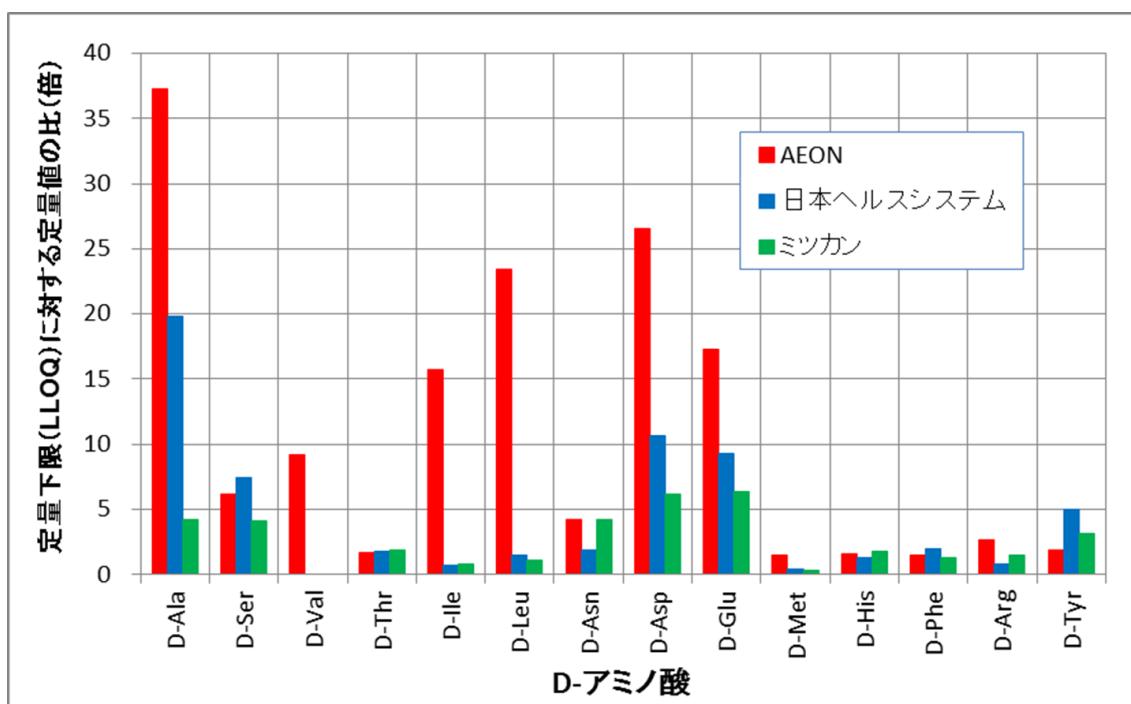


図 3-4. 黒酢中 D-アミノ酸定量値と定量下限

市販の黒酢3商品 (AEON, 日本ヘルスシステム, ミツカン) 中の D-アミノ酸定量値の約 8 割は定量下限 (LLOQ) の 10 倍より低いため, HILIC モード分析による高感度化の有効性が示された。

3-3-5. 食品サンプル中 D-allo-isoleucine (D-allo-Ile) の確認

CR-I(+)カラムを用いて分析した場合, D-allo-Ile と D-Ile は共溶出するため, ピークが検出されたとしても, どちらのものなのか同定することができない. しかし CR-I(-) カラムを用いることで, D-アミノ酸とL-アミノ酸の溶出順序は逆転し, D-allo-IleとD-Ileの両ピークを完全に分離することができるため, 同定が可能となる. 図 3-5 では, D/L-アミノ酸の検量線サンプル(100 nmol/mL in Water)と黒酢サンプルを, 両カラムを用いて分析したクロマトグラムを示した. この結果, 黒酢中には D-allo-Ile のピークのみが検出され, D-Ile は存在しないことが確認できた. 三次らが分析した黒酢でも D-Ile は検出さず D-allo-Ile のみ定量値が示されていた (24). D-allo-Ile のみ検出された理由としては, 図 2-6 に示したように, L-Ile から D-allo-Ile への変換には不斉炭素一ヶ所のラセミ化で成立するが, L-Ile から D-Ile への変換には二ヶ所のラセミ化が必要だからと考え

られる。

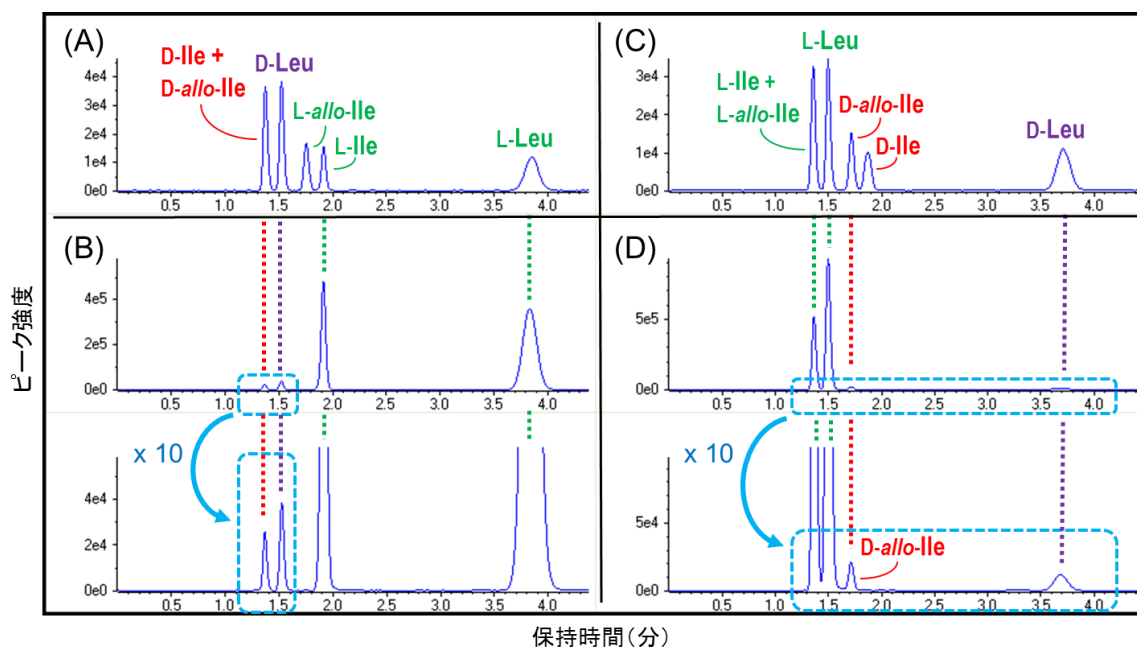


図 3-5. 黒酢(AEON)中 D-allo-Ile の確認

(A) (B) : CR-I(+) カラムを用いて分析, (C) (D) : CR-I(-) カラムを用いて分析

(A) (C) : 検量線サンプル (100 nmol/mL in Water), (B) (D) : 黒酢サンプル (AEON)

移動相条件: ACN/EtOH/Water/TFA = 80/15/5/0.5, カラム: CR-I(+), カラム温度: 30°C,

黒酢中には D-allo-Ile のピークのみ存在 (D-Ile は検出されなかった)。

3-3-6. ピーク同定の信頼度の確認

本分析法はアイソクラティック条件を採用しており、混合標準液を CR-I(±)の両カラムで分析した場合、表 3-3 で示したように、鏡像体のピークの溶出順を逆転させても、D/L-アミノ酸のピーク強度比(面積比)はほぼ一定になる、また、図 3-5 の黒酢を分析した Ile/Leu のクロマトグラムからも、D/L-アミノ酸のピーク面積比はほぼ同じになっていることが観察された。このことから、両方のカラムで分析した D/L-アミノ酸のピーク面積比を比較し、両者が同じような数値を示していれば、ピーク同定が正しく、かつ他の夾雑物との分離が適切になされていることを保証することになる。

そこで、検出された D-アミノ酸の種類が最も多かった黒酢(AEON)のデータを用いてピーク同定の信頼度を確認した。図 3-6 には一例として Asp と Glu のケースを示した。

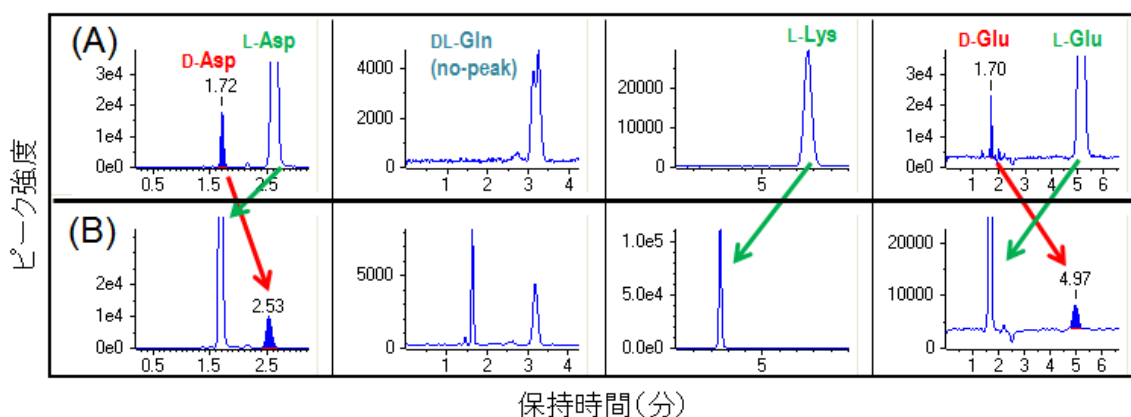


図 3-6. 黒酢(AEON)を両カラム(CR-I(+))および CR-I(-))を用いて分析した際の鏡像体のピーク面積比(L-アミノ酸/D-アミノ酸)の算出例(Asp および Glu)

(A) CR-I(+)) カラムを用いて分析, (B) CR-I(-)) カラムを用いて分析

移動相条件: ACN/EtOH/Water/TFA = 80/15/5/0.5, カラム温度: 30°C.

Asp と Glu は共に両方の鏡像体が検出され, ピーク面積比を算出.

Gln は両鏡像体とも検出されておらず, Lys は L-体しか検出されなかったため面積比の算出不可.

[(A)の L-Asp 面積]/[(A)の D-Asp 面積]=13.4, [(B)の L-Asp 面積]/[(B)の D-Asp 面積]=11.3

[(A)の L-Glu 面積]/[(A)の D-Glu 面積]=29.0, [(B)の L-Glu 面積]/[(B)の D-Glu 面積]=26.0.

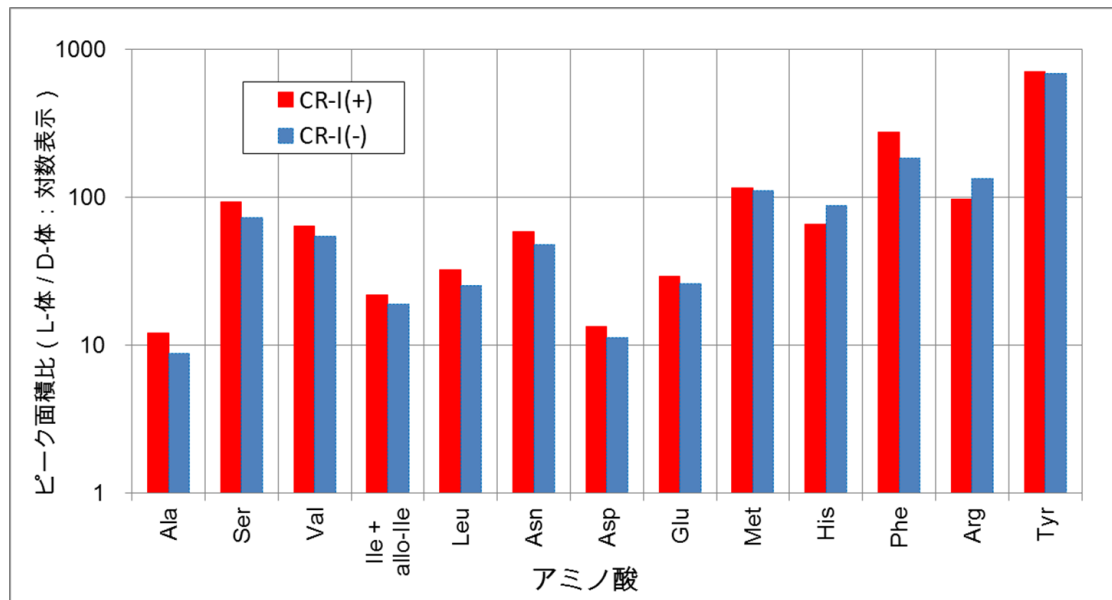


図 3-7. 黒酢(AEON)を両カラム(CR-I(+))および CR-I(-))を用いて分析した際の各アミノ酸鏡像体のピーク面積比(L-アミノ酸/D-アミノ酸)の比較

検出された全てのアミノ酸に対して, 「CR-I(+))カラムを用いて分析した時の[L-体の面積]/[D-体の面積]」および「CR-I(-))カラムを用いて分析した時の[L-体の面積]/[D-体の面積]」を算出し, 比較した.

両カラムを用いて分析したピーク面積比は近似していた(ピーク同定の信頼度が高いことを示唆)

CR-I(+)カラムで分析すると[(L-Asp)/(D-Asp)]のピーク面積比は 13.4 となり, CR-I(-)カラムで分析すると 11.3 となった. 同様に[(L-Glu)/(D-Glu)]のピーク面積比は 29.0 と 26.0 であった. さらに他のアミノ酸についてもピーク面積比を算出し, それらの結果をまとめて図 3-7 に示した. なお, Thr, Cys, Gln, Lys, Trp については, CR-I(-)カラムで分析した際に D-アミノ酸のピークが検出されなかったため, 解析対象から除いた.

図 3-7 から両カラムで分析したピーク面積比は近似していることが確認でき, 本分析法を用いた場合のピーク同定, および夾雑ピークとの分離はほぼ適切に行われていると推察された.

3-4. 小括

食品中 D-アミノ酸を定量するために, 前処理条件と移動相組成を最適化し, 確立した分析法が実用的なものであるか評価した. その結果, 新規分析法では, 検量線の直線性や高い回収率, 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. さらに, D-アミノ酸を多く含むことが報告されている食品(黒酢, キムチ, ヨーグルト)を分析し, これまでの報告と同じような傾向の結果が得られた.

また, 表 1-2 に記した分析法の中で, Müller 法では IBLC (Isobutyryl-L-cysteine) を, 老川法では NAC (N-Acetyl-L-cysteine) を誘導体化試薬として用いている. これらの試薬はいずれも Cys の誘導体であり, 分子内に SH 基を有するため Cys を分析することができない. 一方, バリデーションの結果(表 3-4) から, 新規分析法では Cys も定量可能という利点も兼ね備えていることが示された.

第四章 測定対象化合物の拡張

4-1. 緒言

食品や生体試料中には、タンパク質構成アミノ酸だけでなく、それ以外のアミン類も多数存在し、それらの中にも生理活性を有したり、バイオマーカー候補となりうる化合物が含まれている。そして、同一の分子量を有する化合物(例:D/L-Alaに対する β -AlaやSarcosineなど)(図4-1)を定量するには、各々がクロマトグラム上で分離されることを予め確認しておく必要がある。

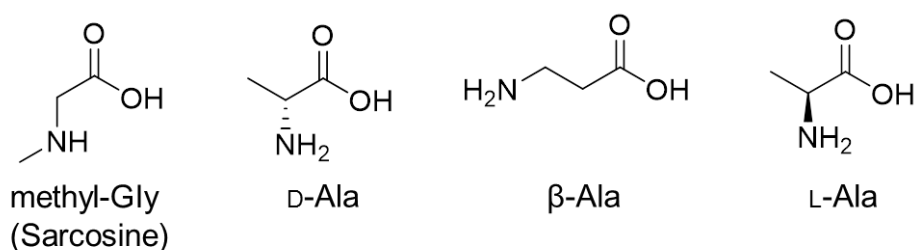


図 4-1. Ala と同一分子量を有するアミン類(分子式:C₃H₇NO₂)
いずれも Extracted ion of [M+H]⁺ = 90.0555 で検出(クロマトグラム上での分離が必要)

既存のアミノ酸分析法の多くは誘導体化処理を伴い、蛍光検出器を用いてピークの検出・同定を行っている。ただしそれらの方法では分子量が異なる化合物を同一の蛍光波長で検出するため、全ての化合物ピークがクロマトグラム上で分離されていなければならない。また、未知ピークが存在した場合、分子量情報が不明なため化合物の同定は非常に難しい。

我々が開発した分析法は誘導体化処理を必要とせず、高分解能の TOFMS を用いて検出するため、精密質量による分離が可能で、測定対象の拡張や同定が他の分析法に比べ容易に行える。そこで、タンパク質構成アミノ酸以外のアミン類の検出・同定が可能であるか検討した。

4-2. 実験方法

4-2-1. 試薬

標準液の溶媒や LC 移動相の調製に用いる試薬は、3-2-1 項と同じものを用いた。タンパク質構成アミノ酸については表 2-2 と同じ試薬を用いた。非タンパク質構成アミノ酸やその他のアミン類、アミノ酸混合試薬については、表 4-1 にまとめて記した。

また、アミノ酸混合標準液 AN-2 型および B 型を和光純薬工業から購入した。両混合標準液には以下の化合物が含まれている。

AN-2 型

L-Alanine, β -Alanine, L- α -Aminoadipic Acid, DL- α -Aminobutyric Acid, DL- β -Aminoisobutyric Acid, L-Aspartic Acid, L-Citrulline, L-Cystathionine, L-Cystine, L-Glutamic Acid, Glycine, Hydroxy-L-proline, L-Isoleucine, L-Leucine, L-Methionine, o-Phosphoserine, o-Phosphoethanolamine, L-Proline, L-Phenylalanine, L-Serine, Sarcosine, Taurine, L-Threonine, L-Tyrosine, Urea, L-Valine.

B 型

γ -Aminobutyric Acid, Ammonium Chloride, L-Anserine, L-Arginine, L-Carnosine, Ethanolamine, L-Histidine, DL- plus *allo*- δ -Hydroxylysine, L-Ornithine, L-Lysine, L-1-Methylhistidine, L-3-Methylhistidine.

4-2-2. アミノ酸・アミン類の混合標準液の調製, 組合せ

アミノ酸・アミン類は、まず 50%MeOH または 50%MeOH-0.05 mol/L-HCl に溶解して標準液を調製した。新規に調製した各アミノ酸・アミン類の標準液、および和光社製のアミノ酸混合標準液は、分子量やピーク強度などを考慮して適切な組合せと希釈倍率を決定し、移動相で希釈した。

表 4-1. 非タンパク質構成アミノ酸およびその他のアミン

試薬名	略語	購入先
DL-Ethionine		Acros Organics (ヘール, ベルギー)
DL-Pyroglutamic Acid		ICN Biochemicals (カリフォルニア, 米国)
Adenine		キシダ化学 (大阪, 日本)
Uracil		ナカライテスク (京都, 日本)
DL- α -Aminoadipic Acid		
L- β -Aminoisobutyric Acid #	L- β -AIBA	
Creatinine		
Cystathionine (mixture of DL-, DL- <i>allo</i> -)	CST	シグマアルドリッチ・ジャパン (東京, 日本)
<i>cis</i> -4-Hydroxy-D-proline		
DL-Kynurenine		
DL-Pipecolic Acid		
DL-2-Aminopimelic Acid		
DL-Citrulline		
Cystine (DL- and <i>meso</i> - mixture)		
DL-2,4-Diaminobutyric Acid		
Dihydrochloride		
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-DL-alanine	DL-Dopa	東京化成工業
DL-Homophenylalanine		
DL-Homoserine		
DL-Norvaline	DL-nor-Val	
DL-Ornithine Monohydrochloride		
β -Alanine	β -Ala	
Allantoin		
DL-Allothreonine	DL- <i>allo</i> -Thr	
Anthranilic Acid		
γ -Aminobutyric Acid	GABA	
Betaine		
Creatine		
Cytosine		
<i>N,N</i> -Dimethylglycine	DMG	和光純薬工業
Dopamine Hydrochloride		
Guanine		
Histamine		
<i>trans</i> -4-Hydroxy-L-proline		
Hypotaurine		
Nicotinamide		
Nicotinic Acid		
Sarcosine		
Thymine		

#: D- β -AIBA として試薬を購入したが、メーカー側のミスにより L- β -AIBA であったことが、後日メーカーの内部検査で判明.

4-3. 結果と考察

4-3-1. アミノ酸・アミン類のピーク形状と分離度

CR-I(+)カラムを用いて、アミノ酸・アミン類を分析した際のクロマトグラムを図 4-2 および図 4-3 に、各化合物の保持時間と分離度を表 4-2 に示した。

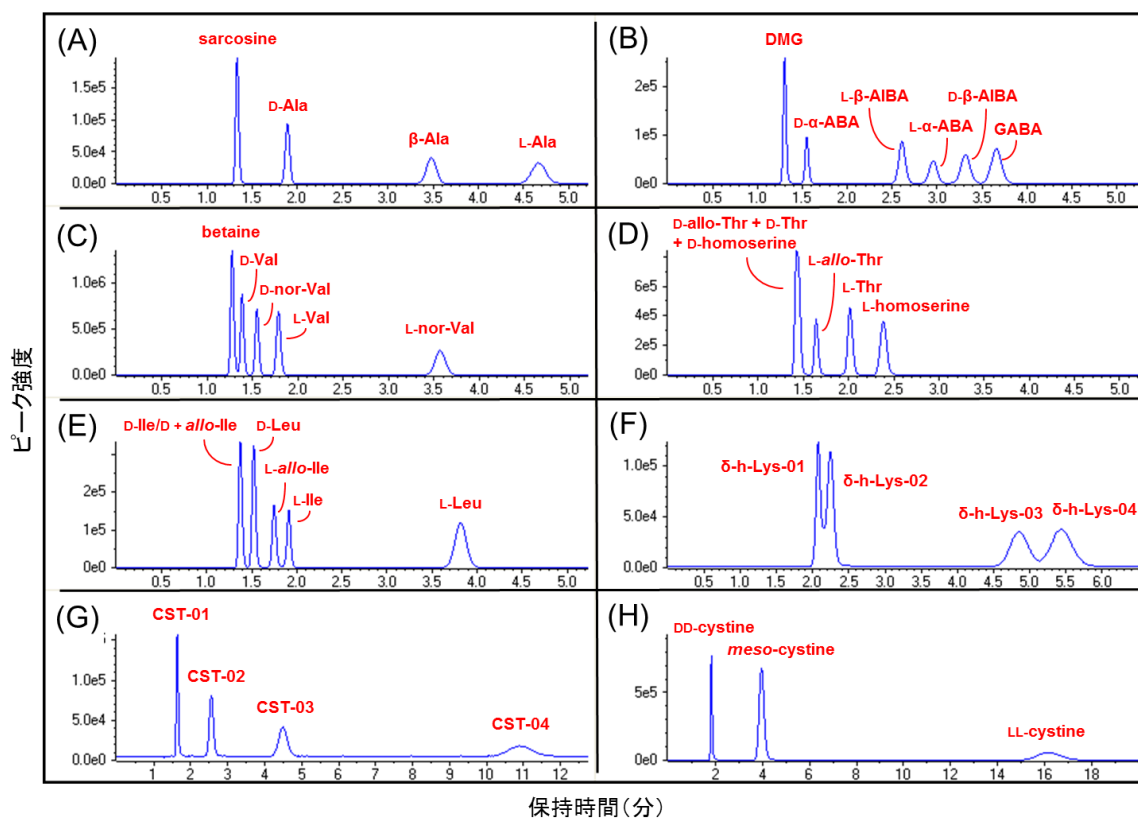


図 4-2. 同一分子量を有するアミノ酸およびアミン類標準液の LC-MS クロマトグラム
移動相条件: ACN/EtOH/Water/TFA = 80/15/5/0.5, カラム: CR-I(+), カラム温度: 30°C,

(A) $[M+H]^+ = 90.0555$ (sarcosine, DL-Ala, and β -Ala)

(B) $[M+H]^+ = 104.0712$ (N,N-dimethylglycine (DMG), DL- α -aminobutyric acid (DL- α -ABA), DL- β -aminoisobutyric acid (DL- β -AIBA), and GABA)

(C) $[M+H]^+ = 118.0868$ (betaine, DL-Val, and DL-norvaline (DL-nor-Val))

(D) $[M+H]^+ = 120.0661$ (DL-Thr, DL-*allo*-Thr, and DL-homoserine)

(E) $[M+H]^+ = 132.1025$ (DL-Ile, DL-*allo*-Ile, and DL-Leu)

(F) $[M+H]^+ = 163.1083$ (DL- plus DL-*allo*- δ -hydroxylysine (δ -h-Lys-01, 02, 03, 04))

(G) $[M+H]^+ = 223.0753$ (DL- plus DL-*allo*-cystathionine (CST-01, 02, 03, 04))

(H) $[M+H]^+ = 241.0317$ (DD-, LL- plus meso-cystine)

δ -hydroxylysine の分離は不完全だが、それ以外の化合物は良好な分離($R_s \geq 1.5$)を示した。

タンパク質構成アミノ酸と同様, 非タンパク質構成アミノ酸においても, 第一級アミンの鏡像体はすべて, クロマトグラム上で良好に分離されていた. 一方, hydroxyproline や pyroglutamic acid などの第二級アミンに関しては, CR-I カラムの特性上いずれの鏡像体も分離されなかったが, ピーク形状は良好であった.

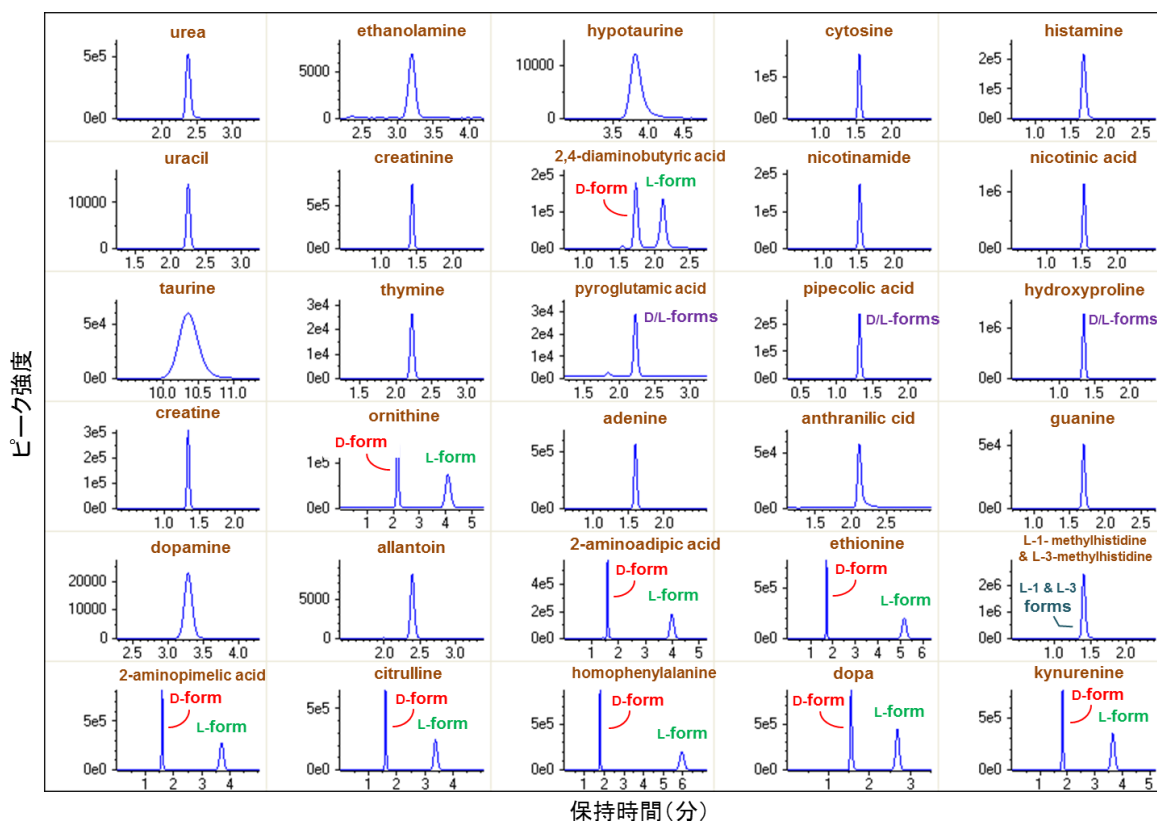


図 4-3. その他のアミン類標準液の LC-MS クロマトグラム

移動相条件: ACN/EtOH/Water/TFA = 80/15/5/0.5, カラム: CR-I(+), カラム温度: 30°C,

第一級アミンのアミノ酸鏡像体は良好な分離, 第二級アミン (pyroglutamic acid, pipecolic acid, hydroxyproline, and methylhistidine) の鏡像体は共溶出.

第三章では 18 種類のタンパク質構成アミノ酸のピーク形状と鏡像体分離を主眼に, 移動相の最適化を行ったが, 移動相組成を変更していく中で, その他の化合物の保持時間やピーク形状も変化していった. 一例として GABA と同一の分子量を持つ 6 化合物 (分子式: $C_4H_9NO_2$) (図 4-4) が移動相組成を変化させた際に, どのように変化していったかを図 4-5 に示した.

表 4-2. アミノ酸およびアミン類の分子式, 抽出イオン([M+H]⁺), 保持時間
および分離度 (R_s)

番号	分子式	[M + H] ⁺	化合物	保持時間(分)	分離度	備考
1	CH ₄ N ₂ O	61.0402	urea	2.37		
2	C ₂ H ₇ NO	62.0606	ethanolamine	3.20		
3	C ₂ H ₅ NO ₂	76.0399	glycine	3.67		
4	C ₃ H ₇ NO ₂	90.0555	sarcosine	1.33	6.85	
5			D-alanine	1.89	10.04	
6			β-alanine	3.48	4.43	
7			L-alanine	4.67		
8	C ₄ H ₉ NO ₂	104.0712	<i>N,N</i> -dimethylglycine	1.30	3.63	
9			D-α-aminobutyric acid	1.55	9.71	
10			L-β-aminoisobutyric acid	2.61	2.17	
11			L-α-aminobutyric acid	2.96	1.90	
12			D-β-aminoisobutyric acid	3.32	1.59	
13			γ-aminobutyric acid	3.66		
14	C ₃ H ₇ NO ₃	106.0504	D-serine	1.67	5.52	
15			L-serine	2.31		
16	C ₂ H ₇ NO ₂ S	110.0276	hypotaurine	3.83		
17	C ₄ H ₅ N ₃ O	112.0511	cytosine	1.55		
18	C ₅ H ₉ N ₃	112.0875	histamine	1.69		
19	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	113.0589	uracil	2.25		
20	C ₄ H ₇ N ₃ O	114.0667	creatinine	1.43		
21	C ₅ H ₉ NO ₂	116.0712	D-proline	1.34	-	第二級アミン
22			L-proline	1.34		
23	C ₅ H ₁₁ NO ₂	118.0868	betaine	1.28	1.64	
24			D-valine	1.39	2.26	
25			D-norvaline	1.55	2.85	
26			L-valine	1.79	11.13	
27			L-norvaline	3.57		
28	C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₂	119.0821	D-2,4-diaminobutyric acid	1.74	3.16	
29			L-2,4-diaminobutyric acid	2.12		
30	C ₄ H ₉ NO ₃	120.0661	D- <i>allo</i> -threonine	1.42	-	D- <i>allo</i> -体
31			D-threonine	1.42	0.38	/D-体
32			D-homoserine	1.45	2.55	
33			L- <i>allo</i> -threonine	1.64	4.54	

34			L-threonine	2.00	3.43	
35			L-homoserine	2.39		
36	C ₃ H ₇ NO ₂ S	122.0276	D-cysteine	1.63	10.18	
37			L-cysteine	2.91		
38	C ₆ H ₆ N ₂ O	123.0558	nicotinamide	1.51		
39	C ₆ H ₅ NO ₂	124.0399	nicotinic acid	1.53		
40	C ₂ H ₇ NO ₃ S	126.0225	taurine	10.35		
41	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	127.0508	thymine	2.23		
42	C ₅ H ₇ NO ₃	130.0504	D-pyroglutamic acid	2.24	-	第二級アミン
43			L-pyroglutamic acid	2.24		
44	C ₆ H ₁₁ NO ₂	130.0868	D-pipecolic acid	1.32	-	第二級アミン
45			L-pipecolic acid	1.32		
46	C ₅ H ₉ NO ₃	132.0661	cis-4-hydroxy-D-proline	1.35	-	第二級アミン
47			trans-4-hydroxy-L-proline	1.35		
48	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	132.0773	creatine	1.34		
49	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.1025	D- <i>allo</i> -isoleucine	1.37	-	D- <i>allo</i> -体
50			D-isoleucine	1.37	1.98	/D-体
51			D-leucine	1.52	2.81	
52			L- <i>allo</i> -isoleucine	1.75	2.02	
53			L-isoleucine	1.91	11.59	
54			L-leucine	3.82		
55	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	133.0613	D-asparagine	1.50	3.43	
56			L-asparagine	1.79		
57	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	133.0977	D-ornithine	2.16	7.39	
58			L-ornithine	4.08		
59	C ₄ H ₇ NO ₄	134.0453	D-aspartic acid	1.71	7.26	
60			L-aspartic acid	2.62		
61	C ₅ H ₅ N ₅	136.0623	adenine	1.60		
62	C ₇ H ₇ NO ₂	138.0555	anthranilic acid	2.12		
63	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	147.0770	D-glutamine	1.48	11.14	
64			L-glutamine	2.73		
65	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	147.1134	D-lysine	2.70	9.01	
66			L-lysine	7.57		
67	C ₅ H ₉ NO ₄	148.0610	D-glutamic acid	1.70	14.49	
68			L-glutamic acid	5.12		
69	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	150.0589	D-methionine	1.71	15.63	

70			L-methionine	5.24	
71	C ₅ H ₅ N ₅ O	152.0572	guanine	1.70	
72	C ₈ H ₁₁ NO ₂	154.0868	dopamine	3.28	
73	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	156.0773	D-histidine	1.35	1.95
74			L-histidine	1.50	
75	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	159.0518	allantoin	2.39	
76	C ₆ H ₁₁ NO ₄	162.0766	D-2-aminoadipic acid	1.58	13.03
77			L-2-aminoadipic acid	3.99	
78	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₃	163.1083	δ-hydroxylysine-01	2.08	1.13
79			δ-hydroxylysine-02	2.24	7.71
80			δ-hydroxylysine-03	4.85	1.10
81			δ-hydroxylysine-04	5.43	
82	C ₆ H ₁₃ NO ₂ S	164.0745	D-ethionine	1.71	15.20
83			L-ethionine	5.18	
84	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166.0868	D-phenylalanine	1.52	9.42
85			L-phenylalanine	2.65	
86	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	170.0930	L-1-methylhistidine	1.41	-
87			L-3-methylhistidine	1.41	第二級アミン
88	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175.1195	D-arginine	1.34	6.21
89			L-arginine	1.95	
90	C ₇ H ₁₃ NO ₄	176.0923	D-2-aminopimelic acid	1.59	12.01
91			L-2-aminopimelic acid	3.71	
92	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	176.1035	D-citrulline	1.60	10.82
93			L-citrulline	3.38	
94	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	180.1025	D-homophenylalanine	1.78	15.72
95			L-homophenylalanine	5.95	
96	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182.0817	D-tyrosine	1.53	8.54
97			L-tyrosine	2.57	
98	C ₉ H ₁₁ NO ₄	198.0766	D-dopa	1.54	9.03
99			L-dopa	2.68	
100	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205.0977	D-tryptophan	1.53	8.34
101			L-tryptophan	2.52	
102	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	209.0926	D-kynurenine	1.82	10.33
103			L-kynurenine	3.66	
104	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	223.0753	cystathionine-01	1.64	5.86
105			cystathionine-02	2.56	5.83

106			cystathionine-03	4.49	7.38
107			cystathionine-04	10.90	
108	$C_6H_{12}N_2O_4S_2$	241.0317	DD-cystine	1.84	8.05
109			meso-cystine	3.96	10.25
110			LL-cystine	16.18	

表中で連続する同一分子量の化合物を対象とし、保持時間を t_1 および $t_2 (t_2 > t_1)$, ピーク半値幅を w_{h1} および w_{h2} として、分離度 (Rs) を、以下の計算式を用いて算出した。

$$Rs = 1.18 \times (t_2 - t_1) / (w_{h1} + w_{h2})$$

タンパク質構成アミノ酸を含め 100 種類以上のアミノ酸・アミン類の分析が可能。

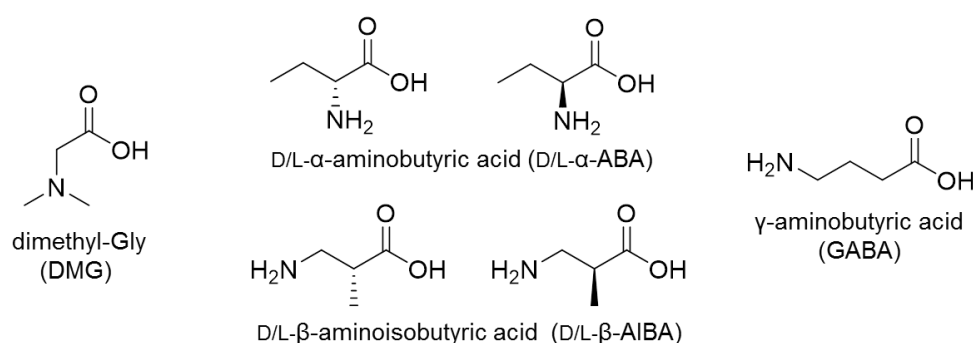


図 4-4. GABA と同一分子量を有するアミン類 (分子式 = $C_4H_9NO_2$)

いずれも Extracted ion of $[M+H]^+ = 104.0712$ で検出 (クロマトグラム上での分離が必要)

移動相組成「ACN/EtOH/Water/TFA = 95/0/5/0.5」では、L-α-ABA ピークの両端が D-β-AIBA および GABA とわずかに重なっていた (図 4-5 (A)). そして ACN の比率を下げている (EtOH の比率を上げていく) 過程の中で L-α-ABA と D-β-AIBA の溶出順序が逆転し、最終条件である「ACN/EtOH/Water/TFA = 80/15/5/0.5」では、6 化合物すべてのベースライン分離を達成することができた (図 4-5 (E)).

浜瀬らの方法では二次元目のキラル分離が不十分な場合、複数のキラルカラムを別途準備してその中から良好な分離が得られるカラムを選択していくという方策が取られている (28). 一方、我々の分析法は、仮に分離が不十分なピークが存在した場合でも移動相組成変更の自由度が高く、さらに CR-I(+)/(-)カラムを入れ替えて分析するという方策も可能という利点を持ち合わせている。

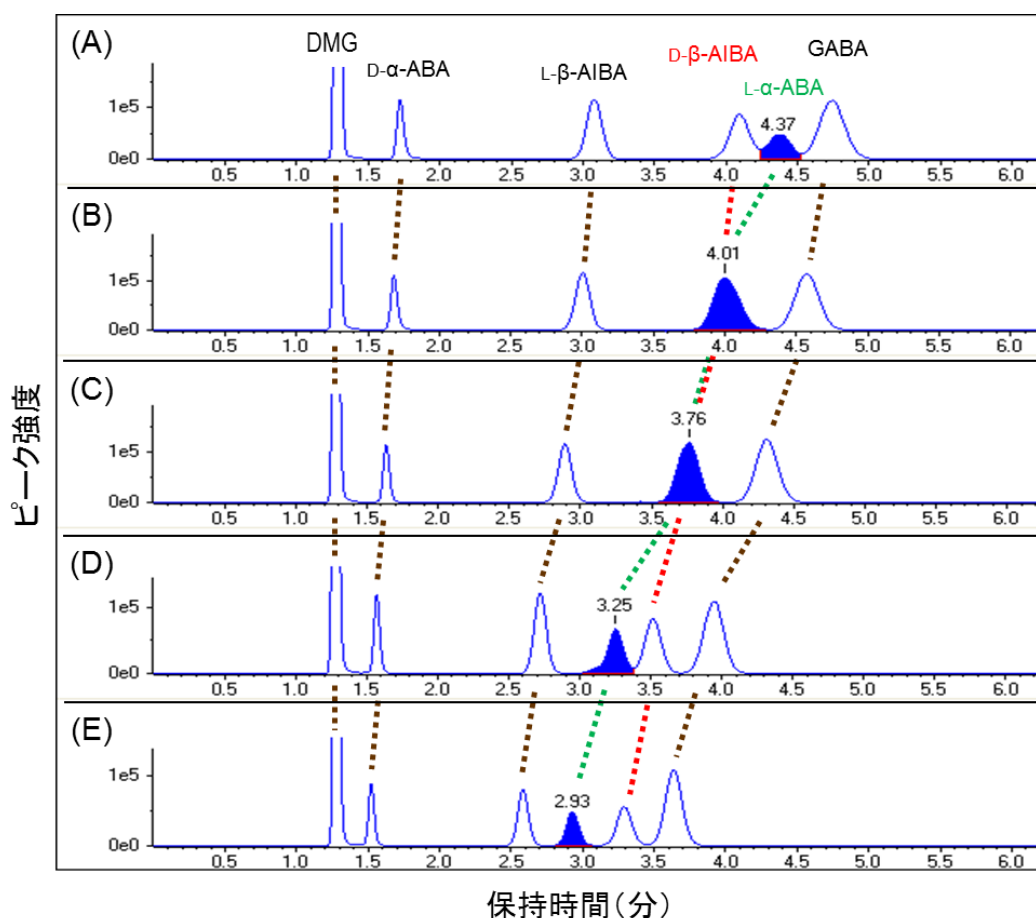


図 4-5. 移動相組成の変更に伴う N,N-dimethylglycine (DMG), D/L- α -aminobutyric acid (D/L- α -ABA), D/L- β -aminoisobutyric acid (D/L- β -AIBA), ならびに GABA の保持時間の変化

移動相条件: ACN/EtOH/Water/TFA = (A) 95/0/5/0.5, (B) 93/2/5/0.5, (C) 90/5/5/0.5, (D) 85/10/5/0.5, (E) 80/15/5/0.5, カラム:CR-I(+), カラム温度:30°C.

移動相組成を変更し, 溶出順を変えることで 6 化合物の完全分離を達成.

4-4. 小括

「誘導体化処理不要かつ精密質量による分離」という新規分析法の特徴を生かして, 測定対象の拡張を行った. その結果, *allo*-体や第二級アミンなど一部のアミノ酸は分離されなかったもののピーク形状は良好であり, 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.

第五章 総括と展望

アミノ酸は最も身近なキラル化合物群の一つであり、アミノ酸のキラル分析は数多くの研究者が長年挑戦してきたキラル分析研究の一大テーマである。そして緒言で述べた既存法の問題点は、我々の研究成果を除くと、現在も状況はほとんど変わっていない。

我々は D-アミノ酸の一斉分析法を開発し、標準液だけでなく食品中の 18 種類の D-アミノ酸を誘導体化せずに、10 分以内で定量することが可能であることを実証した。また、本分析法は非タンパク質構成アミノ酸やその他のアミン類にも適用可能で、タンパク質構成アミノ酸を含め 100 種類以上の分析が可能であることを示した。さらに、サンプルの前処理に関しても、誘導体化が不要というだけでなく、濃縮操作が不要で、高い回収率が得られ、簡便かつ低コストの前処理法となっている。

これらの結果は当初の目標である「①非誘導体化法、②タンパク質構成アミノ酸鏡像体 15 種類以上の分析時間は 30 分以内、③その他のアミン類 30 種類以上の同時分析も可能」を大幅に上回った。この成功の大きな要因は、HILIC モードにおけるキラル固定相とアミノ酸鏡像体の相互作用に着目・利用した点にあったと考えられる。

とはいえ、本研究で開発した新規分析法に関して課題が全く無いというわけではない。そこで、残された 2 つの課題とその対応策について述べる。

まず、検出感度に関しては誘導体化法に比べ 1~2 桁劣っていると思われる。しかしこの点に関しては、高感度の四重極型質量分析計を検出器として用いることで解決可能である。TOFMS による検出モードはフルスキャン(新規分析法では m/z :60~600 をスキャン)であり、化合物ごとに MRM(Multiple Reaction Monitoring)を設定して検出幅を絞ってスキャンする四重極型質量分析計の MS/MS 分析のほうが、一般的に高感度と言われている。我々のグループでは既に四重極型質量分析計(LCMS-8060,

Shimadzu)を用いた検討を行い, LC 条件を変えなくとも LC-TOFMS 法に比べ数十倍高感度に, さらにダイナミックレンジも1~2桁広く検出できることを, 報告済みである(29).

もう一つの課題は, カラムのキラルセクターの特性上, Proline などの第二級アミンの鏡像体を分離できない点である. こちらに関しては第二級アミンの鏡像体分離が可能なキラルカラムが数種類市販されているため, 誘導体化を行わずに Proline を適切な別のキラルカラムを用いて分析することで対応は可能である. 我々のグループでも既に分析系を構築し, 測定した実績がある.

以上のような課題は残されているものの, 本分析法はアミノ酸という生物にとって普遍的に存在する代謝物を測定対象としており, 適用可能なサンプルの種類は多岐に渡る. よって, 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, 本分析法が今後用いられていくことが期待される.

謝辞

本論文は、著者が大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻において行った研究をまとめたものである。

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科 福崎英一郎教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり有益なご指導、ご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科 紀ノ岡正博教授、大阪大学産業科学研究所 永井健治教授、関西大学化学生命工学部 老川典夫教授に心より感謝申し上げます。

また、本研究を完遂するにあたり、ご支援を賜りました大阪大学大学院工学研究科 新聞秀一准教授、九州大学生体防御医学研究所附属トランスオミクス医学研究センター 馬場健史教授に深く感謝申し上げます。

本研究を行うに際し、多大なる協力を賜りました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物資源工学領域 古野正浩研究員、中野洋介修士、谷口百優学士、ならびに諸先輩方、研究員方、学生諸氏、事務の方々に心から感謝の意を表します。

最後に、これまで常に支え続けてくれた家族、友人無くして本研究は成し得なかったことを付記致します。

引用文献

1. **Corrigan, J.J.:** D-Amino Acids in Animal, *Science*, **164**, 142-149 (1969).
2. **Miyoshi, Y., Koga, R., Oyama, T., Han, H., Ueno, K., Masuyama, K., Itoh, Y., and Hamase, K.:** HPLC analysis of naturally occurring free d-amino acids in mammals, *Pharm. Biomed. Anal.*, **69**, 42-49 (2012).
3. **Müller, C., Fonseca, J. R., Rock, T. M., Krauss-Etschmann, S., and Schmitt-Kopplin, P.:** Enantioseparation and selective detection of D-amino acids by ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry in analysis of complex biological samples, *J. Chromatogr. A*, **1324**, 109-114 (2014).
4. **Visser, W. F., Verhoeven-Duif, N. M., Ophoff, R., Bakker, S., Klomp, L. W., Berger, R., and Koning, T. J.:** A sensitive and simple ultra-high-performance-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the quantification of d-amino acids in body fluids, *J. Chromatogr. A*, **1218**, 7130-7136 (2011).
5. **Hashimoto, K., Engberg, G., Shimizu, E., Nordin, C., Lindström, L.H., and Iyo, M.:** Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, **29**, 767-769 (2005).
6. **Sasabe, J., Miyoshi, Y., Suzuki, M., Mita, M., Konno, R., Matsuoka, M., Hamase, K., and Aiso, S.:** D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **109**, 627-632 (2012).
7. **Sasabe, J., Suzuki, M., Miyoshi, Y., Tojo, Y., Okamura, C., Ito, S., Konno, R., Mita, M., Hamase, K., and Aiso, S.:** Ischemic acute kidney injury perturbs homeostasis of serine enantiomers in the body fluid in mice: early detection of renal dysfunction using the ratio of serine enantiomers, *PLoS One*, **9**, e86504 (2014).
8. **鈴木将貴, 笹部潤平, 相磯貞和:** 疾患と D-アミノ酸 — バイオマーカーとしての可能性, *生物工学会誌*, **92**, 661-664 (2014).
9. **東條洋介, 中根舞子, 三田真史, 浜瀬健司:** 皮膚のキラルアミノ酸メタボロミクス, *生物工学会誌*, **92**, 653-656 (2014).
10. **吉川尚子:** 甲殻類における遊離型 D-アミノ酸の生理機能, *D-アミノ酸学会誌*, **2**, 7-11 (2014).
11. **Fujii Noriko, Takata T, Fujii Norihiko, and Aki K.:** Isomerization of aspartyl residues in crystallins and its influence upon cataract, *Biochim Biophys Acta*, **1860**, 183-191 (2016).

12. **Gogami, Y., Ito, K., and Oikawa, T.:** Studies on biosynthesis of D-amino acid in plant: The quantitative analysis of D-amino acids in vegetables and fruits, *Trace nutrients research*, **23**, 1-4 (2006).
13. **Mutaguchi, Y., Ohmori, T., Akano, H., Doi, K., and Ohshima, T.:** Distribution of D-amino acids in vinegars and involvement of lactic acid bacteria in the production of D-amino acids., *Springerplus*, **2**, 691 (2013).
14. 牟田口祐太, 大森勇門, 大島敏久: 乳酸発酵と D-アミノ酸生産, *化学と生物*, **53**, 18-26 (2015).
15. **Ilisz, I., Aranyi, A., Pataj, Z., and Péter, A.:** Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **69**, 28-41 (2012).
16. **Tanwar, S., and Bhushan R. J.:** Enantioresolution of amino acids : a decade's perspective, prospects and challenges, *Chromatographia*, **78**, 1113-1134 (2015).
17. 浜瀬健司: 実試料における微量 D-アミノ酸の二次元 HPLC 精密分析法, *生化学*, **82**, 150-154 (2010).
18. **Gogami, Y., Okada, K., and Oikawa, T.:** High-performance liquid chromatography analysis of naturally occurring d-amino acids in sake, *J. Chromatogr. B*, **879**, 3259– 3267 (2011).
19. **Buszewski B. and Noga S.:** Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique, *Anal Bioanal Chem.* **402**, 231–247 (2012).
20. **Taujenis, L., Olšauskaite, V., and Padarauskas, A.:** Enantioselective determination of protein amino acids in fertilizers by liquid chromatography-tandem mass spectrometry on chiral teicoplanin stationary phase, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 11099-11108 (2014).
21. **Barbaro, E., Zangrando, R., Vecchiato, M., Turetta, C., Barbante, C., and Gambaro, A.:** D- and L-amino acids in antarctic lakes: assessment of a very sensitive HPLC-MS method, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 5259-5270 (2014).
22. 第十六改正日本薬局方 37-409 (2011).
23. 岡田かおり, 郷上佳孝, 竹下義隆, 老川典夫: 黒酢及び米酢中の D-及び L-アミノ酸の定量解析, *Trace Nutrients Research*, **29**, 62-66 (2012).
24. **Miyoshi, Y., Nagano, M., Ishigo S., Ito Y., Hashiguchi K., Hishida N., Mita M., Lindner W., and Hamase K.:** Chiral amino acid analysis of Japanese traditional Kurozu and the developmental changes during earthenware jar fermentation processes, *J. Chromatogr. B*, **966**, 187–192 (2014).

- 25. Knobler, C. B., Gaeta, F. C. A. and Cram, D. J.:** Source of Chiral Recognition in Coraplexes with Phenylglycine as Guest, *Chem. Soc. Chem. Commun.*, 330-333 (1988).
- 26. Cram, D.J., Graaff, R. A. G., Knobler, C.B., Lingenfelter, D. S., Maverick, E. F., and Trueblood, K. N.:** Chiral recognition between host and guest: a binaphthyl-18-crown-6 host with D-phenylglycinium methyl ester perchlorate guest. A difficult structure solved with CRUNCH, *Acta Cryst.*, **B55**, 432-440 (1999).
- 27. 長田裕臣:** 光学活性クラウンエーテルによるアミノ酸の D/L 識別機構の解明, *Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences*, **4**, 105-115 (2010).
- 28. Koga, R., Miyoshi, Y., Sato, Y., Mita, M., Konno, R., Lindner, W., and Hamase, K.:** Enantioselective determination of citrulline and ornithine in the urine of d-amino acid oxidase deficient mice using a two-dimensional high-performance liquid chromatographic system, *J. Chromatogr. A*, **1467**, 312-317 (2016).
- 29. Nakano, Y., Konya, Y., Taniguchi, M., and Fukusaki, E.:** Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of trace D-amino acids, *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 134-138 (2017).

発表論文

本学位論文に關与する論文

1. **Konya, Y., Bamba, T., and Fukusaki, E.**: Extra-facile chiral separation of amino acid enantiomers by LC-TOFMS analysis, *J. Biosci. Bioeng.*, **121**, 349-353 (2016).
2. **Konya, Y., Taniguchi, M., and Fukusaki, E.**: Novel high-throughput and widely-targeted liquid chromatography-time of flight mass spectrometry method for D-amino acids in foods, *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 126-133 (2017).

学会発表

(国際学会)

1. **Konya Y., Taniguchi M. and Fukusaki E.**, “Novel high-throughput and widely-targeted LC-TOFMS method for D-amino acids Metabolomics”, 12th Annual conference of the Metabolomics society, 293, Dublin/Ireland, Jun. 2016.

(国内学会)

1. **紺屋 豊, 谷口 百優, 福崎 英一郎**, “LC-TOFMS を用いた非誘導体化アミノ酸鏡像体の高速一斉分析法の開発”, 第 12 回 D-アミノ酸学会学術講演会, 演題番号 12, 高知, 2016 年 9 月.
2. **谷口 百優, 紺屋 豊, 福崎 英一郎**, “LC-TOFMS を用いたアミノ酸鏡像体を含むアミン類の高速一斉分析法の開発”, 第 12 回 D-アミノ酸学会学術講演会, 演題番号 13, 高知, 2016 年 9 月.
3. **中野 洋介, 紺屋 豊, 谷口 百優, 福崎 英一郎**, “D-アミノ酸の微量定量のための LC-MS/MS 分析法の開発”, 第 12 回 D-アミノ酸学会学術講演会, 演題番号 14, 高知, 2016 年 9 月.
4. **紺屋 豊, 谷口 百優, 福崎 英一郎**, “LC-TOFMS を用いた非誘導体化アミノ酸鏡像体の高速一斉分析法の開発”, 第 68 回日本生物工学会大会, 富山, 2016 年 9 月.

本発表は大会の“トピックス”に採択された。

5. 谷口 百優, 紺屋 豊, 福崎 英一郎, “LC-TOFMS を用いた D, L-アミノ酸を含む生理活性アミン類の一斉分析法の開発”, 第 68 回日本生物工学会大会, 富山, 2016 年 9 月.

6. 中野 洋介, 紺屋 豊, 谷口 百優, 福崎 英一郎, “D-アミノ酸の微量定量のための LC-MS/MS 分析法の開発”, 第 68 回日本生物工学会大会, 富山, 2016 年 9 月.

付録

付録 1-1. 3つの施設で測定された黒酢中 D-アミノ酸の定量値と比率(%D)

研究グループ (試料名)	岡田/老川 (A社 #17)		三次/浜瀬 (Local-D)		牟田口/大島 (High-brix)	
	nmol/mL	%D	nmol/mL	%D	nmol/mL	%D
D-アミノ酸濃度 と比率(%D ^a)						
Ala	887.0	13.0	846.0	13.2	534.4	9.2
Ser	75.2	3.3	95.9	3.4	431.4	16.1
Pro	39.9	4.0	24.5	1.1	N.D.	
Val	121.1	4.1	trace		6.3	0.2
Thr + <i>allo</i> -Thr ^b	N.D. ^d		trace		N.D.	
Cys	N.D.		N.D.		N.D.	
Ile + <i>allo</i> -Ile ^c	2.5	0.2	10.5	0.6	N.D.	
Leu	10.2	0.3	18.1	0.5	224.7	6.7
Asn	N.D.		10.4	2.4	188.9	17.1
Asp	157.0	8.1	282.0	9.6	631.3	20.5
Gln	N.D.		N.D.		N.D.	
Lys	7.4	0.8	N.D.		N.D.	
Glu	77.7	3.3	171.0	5.8	241.6	16.6
Met	N.D.		N.D.		N.D.	
His	36.9	10.2	trace		N.D.	
Phe	4.6	0.2	trace		214.9	11.4
Arg	6.5	0.4	N.D.		93.2	5.4
Tyr	28.1	1.7	N.D.		148.3	8.7
Trp	N.D.		N.D.		N.D.	
D-アミノ酸検出数	13 種		8 種 (trace 4 種)		10 種	

a : %D=D/(D + L)×100, b : D-Thr, D-*allo*-Thr および D-homoserine の合算,

c : D-Ile と D-*allo*-Ile の合算, d : 検出限界以下 (Not detected).

表中の定量値の中で, 最低濃度は 2.5 nmol/mL, 最高濃度は 887.0 nmol/mL,

引用文献は, (23) 岡田ら, (24) 三次ら, (13) 牟田口ら.

■使用上の注意点(逆相モード) ダイセル「カラム取扱説明書」

【逆相系移動相の場合】

推奨移動相条件

A 移動相

水溶液 ^①	過塩素酸水溶液
有機溶媒 ^②	CH ₃ CN, MeOH, EtOH, IPA, THF, AT
標準的な移動相組成 ^③	過塩素酸水溶液 (pH=1.5) / CH ₃ CN = 80 / 20

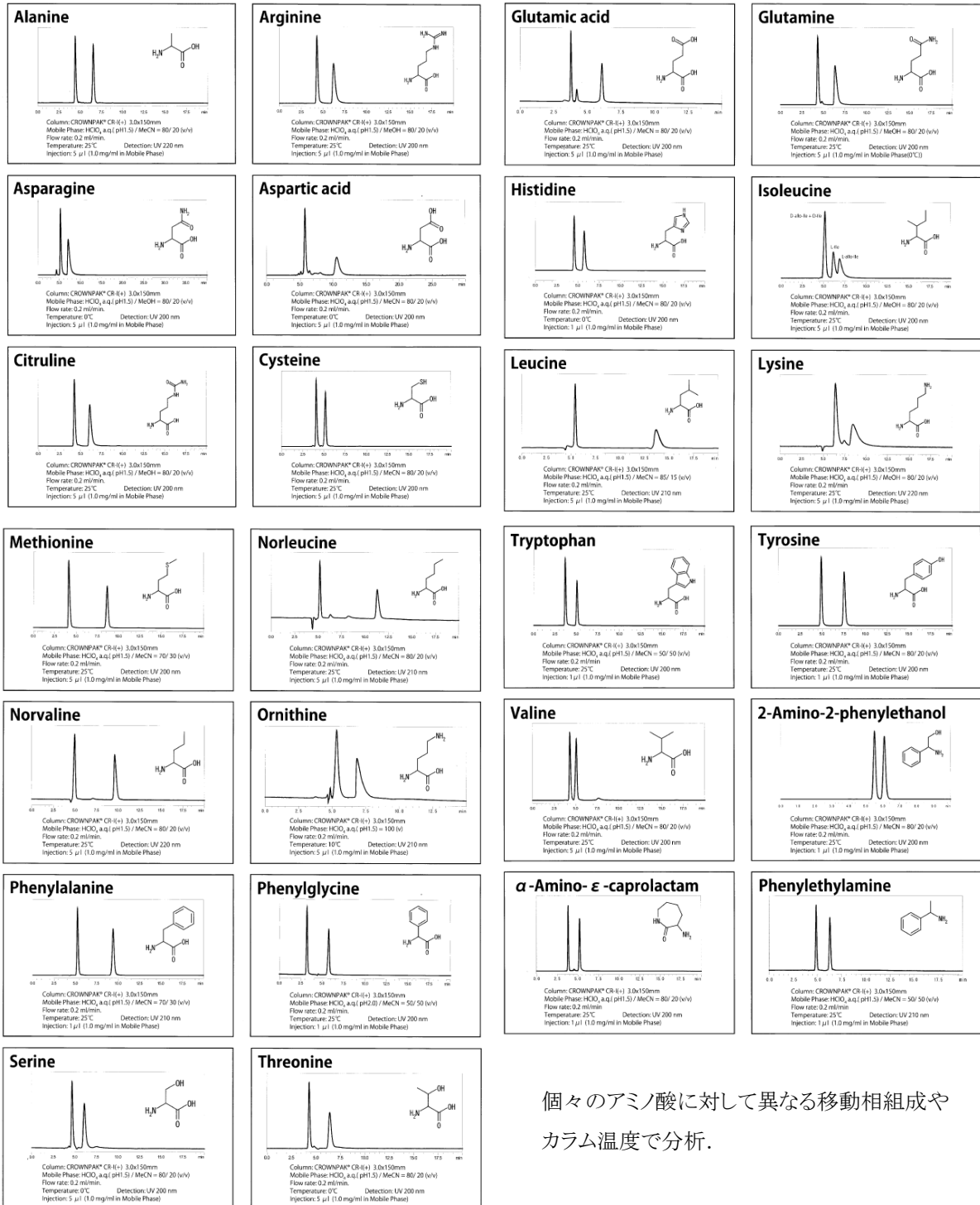
CH₃CN: アセトニトリル, MeOH: メタノール, EtOH: エタノール, IPA: 2-プロパノール, THF: テトラヒドロフラン, AT: アセトン

- ・標準的には pH = 1.0 ~ 2.0 でご使用いただくと、良い分離が得られます (pH = 7.0 までお使いいただけます)。
- ・pH を低くすると、一般に保持が長くなり良い分離が得られます。カラムを長くお使いいただくためには、満足のいく分離が得られる、最も高い pH に条件を設定してお使い下さい。
- ・温度を下げると、保持が長くなり分離が良くなる傾向があります。
- ・硝酸やトリフルオロ酢酸などの過塩素酸以外の酸もご使用いただけますが、多くの場合、過塩素酸水溶液を使用した方が分離能力は高く、また移動相の UV 吸収も抑えることができます。

付録 2-2. CROWNPAK CR-I(+) アミノ酸・アミン・アミノアルコール分離例

CROWNPAK® CR-I(+)

アミノ酸・アミン・アミノアルコール 分離例



個々のアミノ酸に対して異なる移動相組成や
カラム温度で分析。

付録 3-1. 検量線サンプルと食品ブランクサンプルの LC-MS クロマトグラム

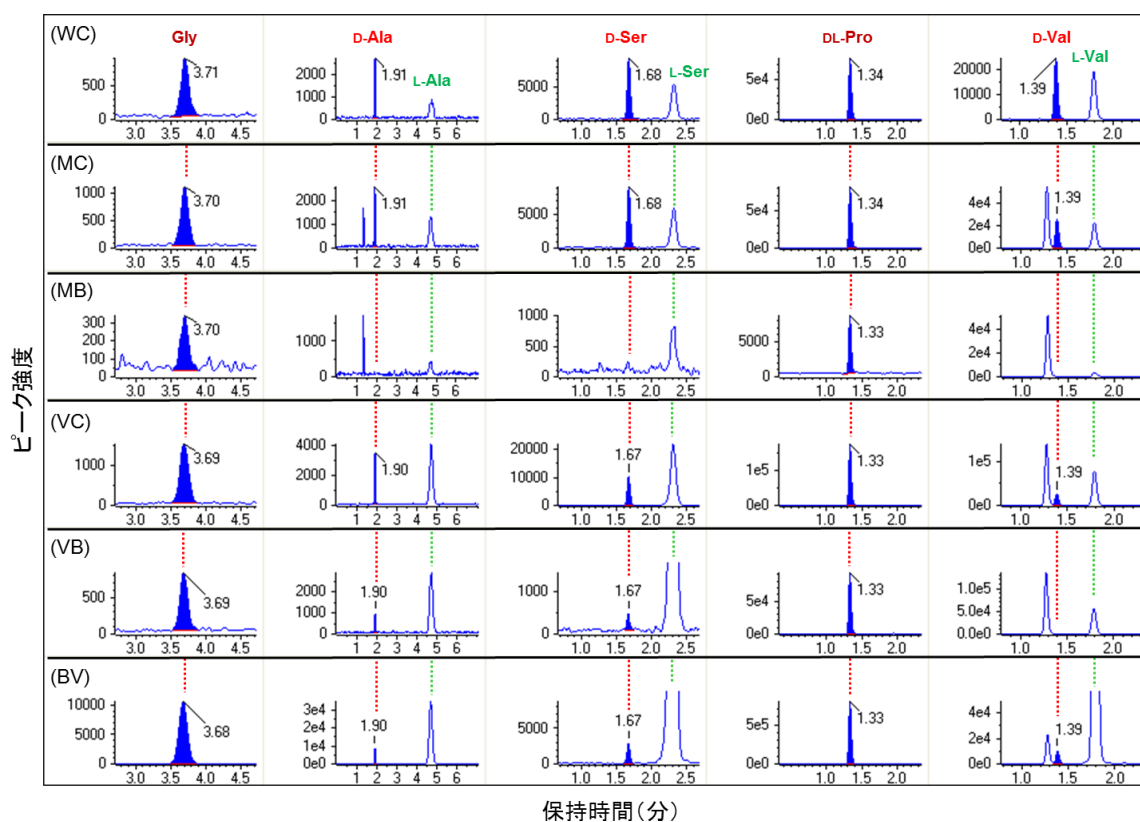
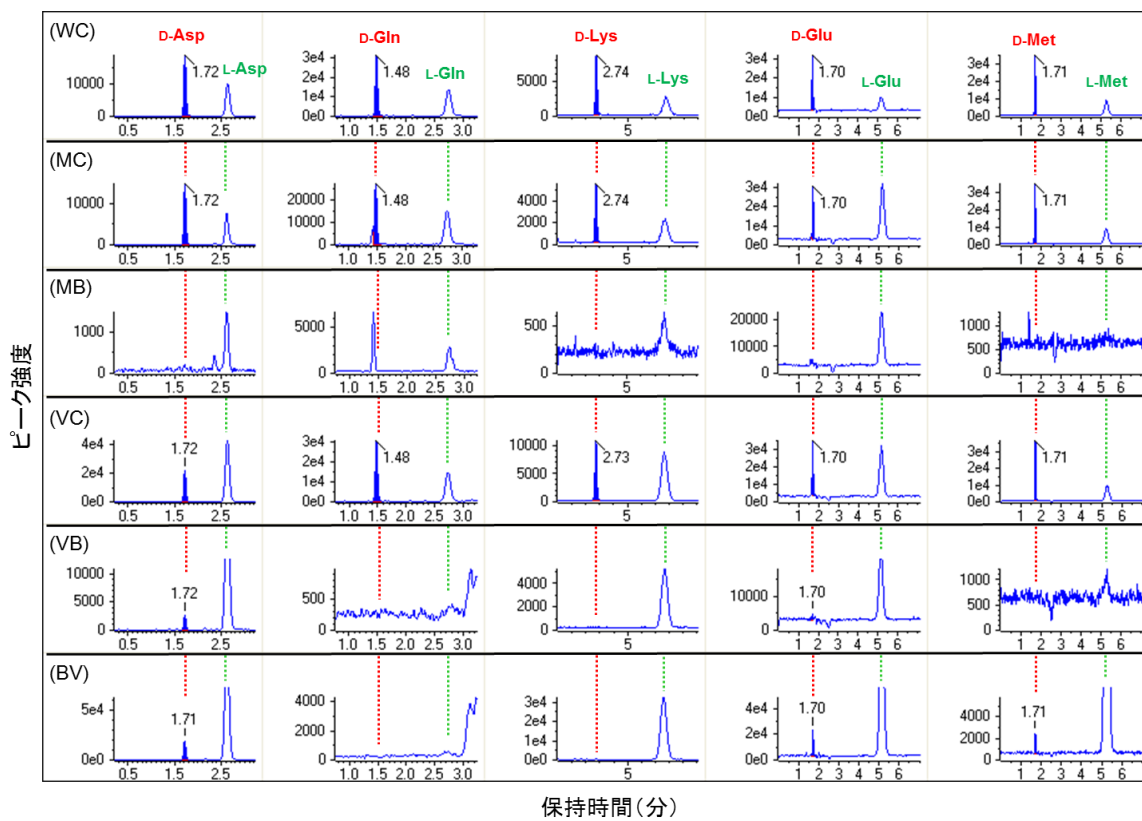
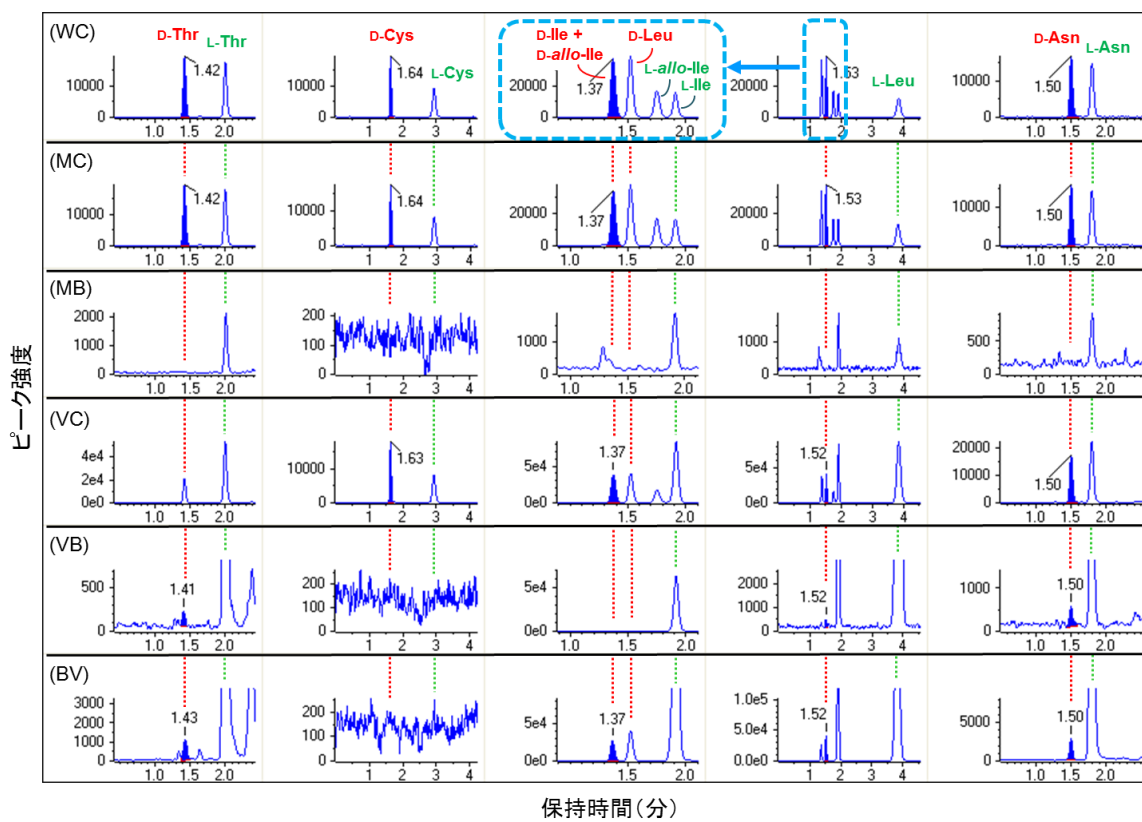


図 S3-1. 検量線サンプルと食品ブランクサンプルの LC-MS クロマトグラム

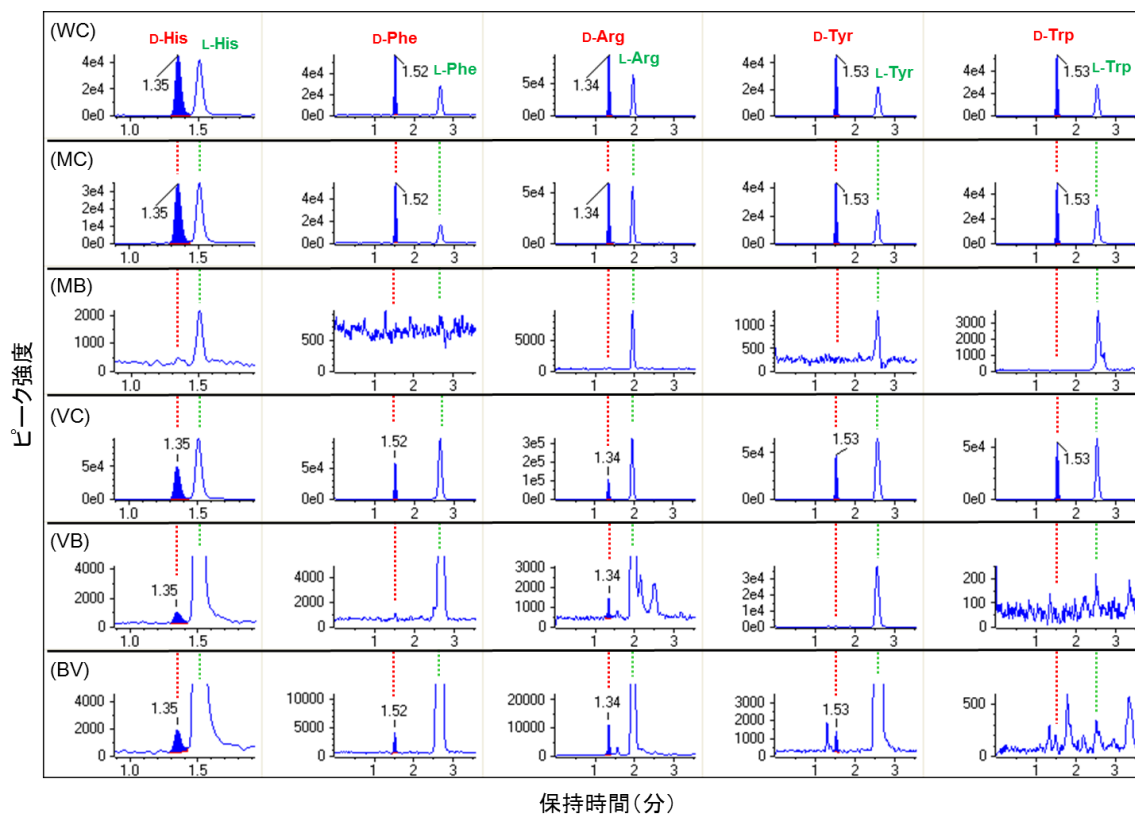
移動相条件: ACN/EtOH/Water/TFA = 80/15/5/0.5, カラム:CR-I(+), カラム温度:30℃.

- (WC) 水検量線 (100 nmol/mL in water)
- (MC) 牛乳検量線 (100 nmol/mL in milk)
- (MB) 牛乳ブランク (Milk blank)
- (VC) 穀物酢検量線 (100 nmol/mL in grain vinegar)
- (VB) 穀物酢ブランク (Vinegar blank)
- (BV) 黒酢(AEON)ブランク (Black vinegar (AEON) blank)

付録 3-1. (続き)



付録 3-1. (続き)



付録 3-2. 食品サンプル(黒酢, キムチ, ヨーグルト)の LC-MS クロマトグラム

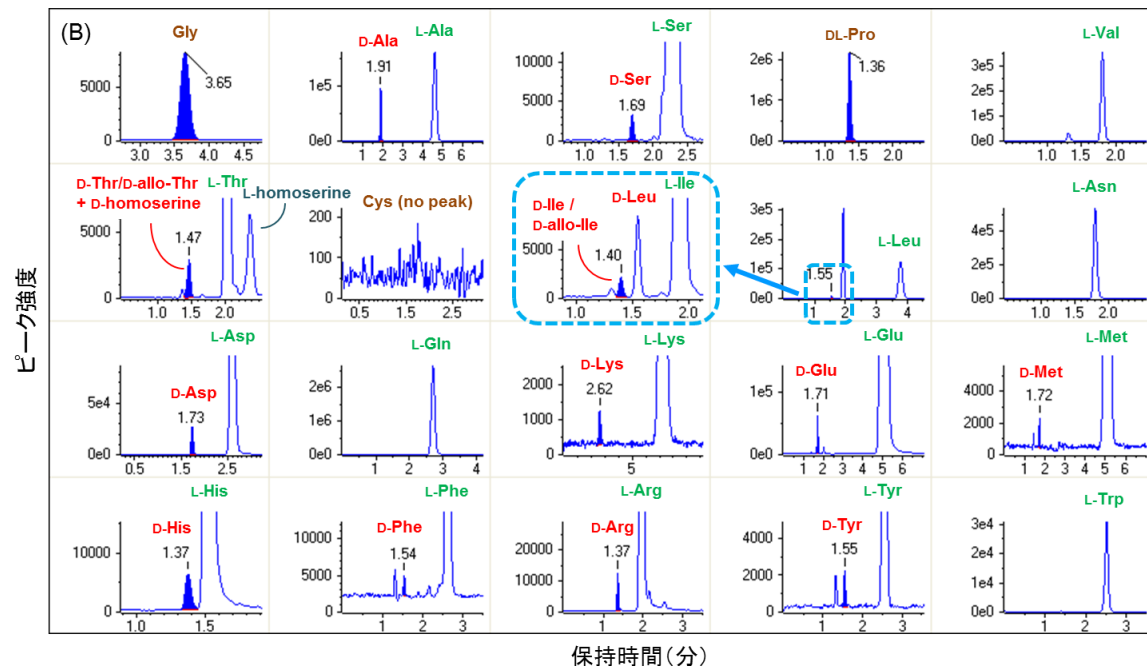
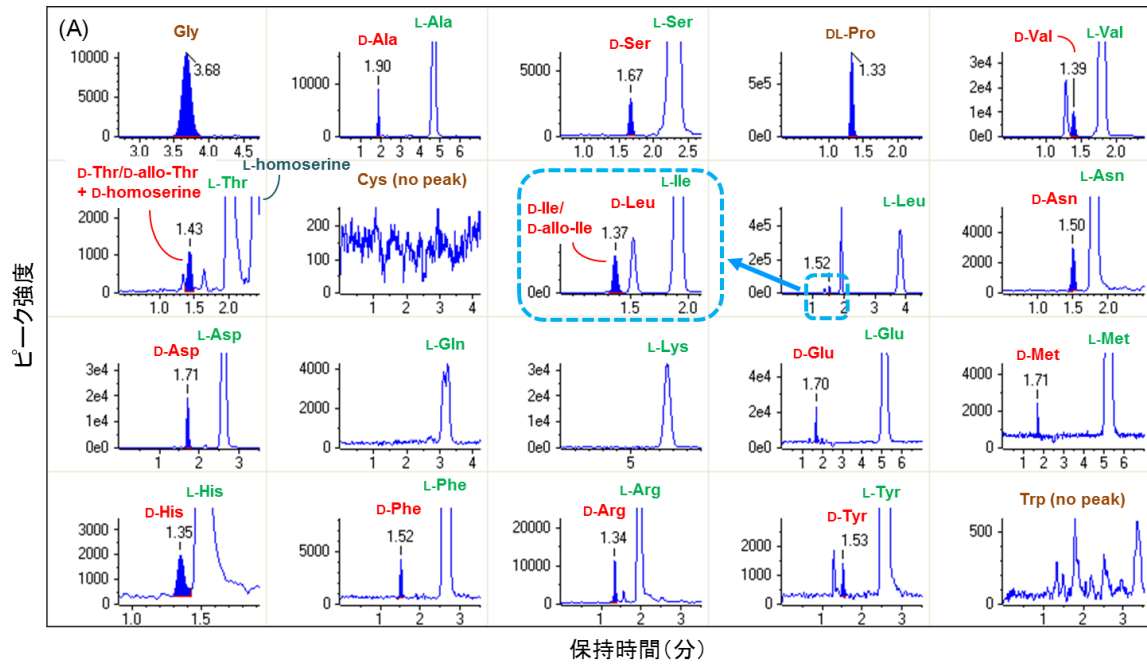
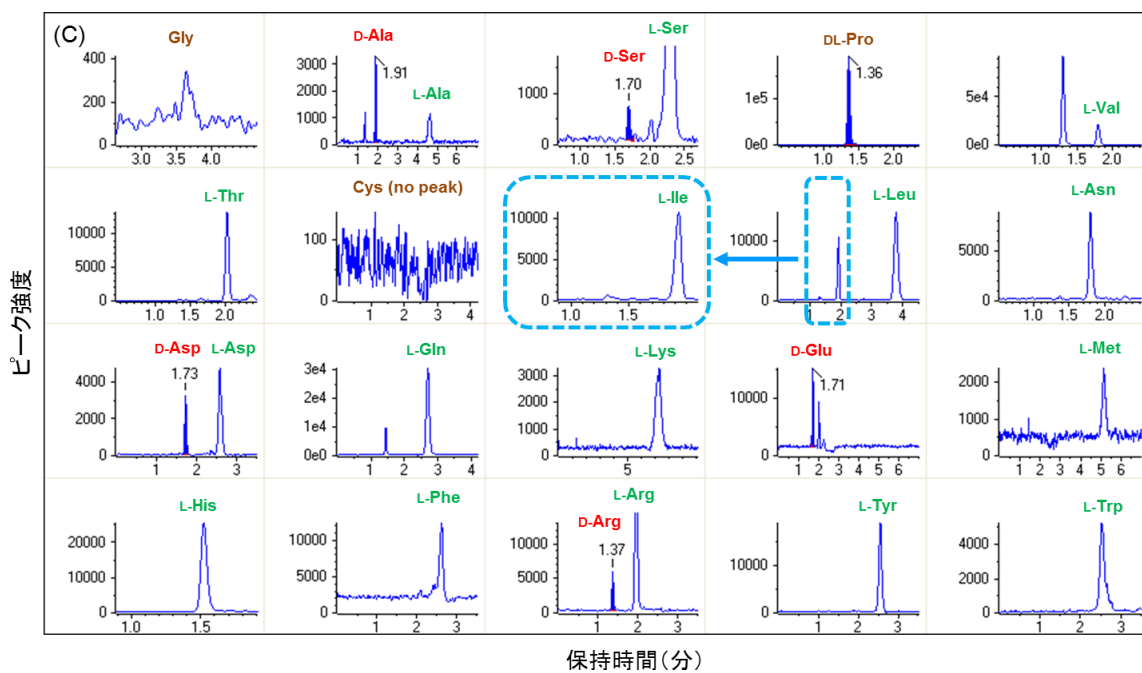


図 S3-2. 食品サンプル(黒酢, キムチ, ヨーグルト)の LC-MS クロマトグラム

移動相条件: ACN/EtOH/Water/TFA = 80/15/5/0.5, カラム:CR-I(+), カラム温度:30℃,

(A) 黒酢(AEON), (B) キムチ(イチオシ), (C) ヨーグルトドリンク(LB81).

付録 3-2. (続き)



付録 3-3. 検量線 (Water) の真度と精度

アミノ酸	検量線の濃度 (nmol/mL)															
	1		4		10		40		100		400		100		(nmol/mL)	
	平均 ^a	RSD ^b	平均	RSD	平均	RSD	平均	RSD	平均	RSD	平均	RSD	平均	RSD	LOD ^c	LLOQ ^d
D-Ala					98.7	14.1	104.0	2.1	103.2	4.4	99.6	4.4	94.4	3.4	10	10
D-Ser			93.9	16.7	115.0	9.2	102.2	9.3	98.5	3.8	97.8	0.9	92.6	4.8	4	4
D-Val			97.2	15.4	106.6	2.8	101.9	2.3	100.3	1.8	100.5	2.0	93.6	3.8	4	4
D-Thr	98.0	28.1	106.3	7.4	104.5	1.8	98.3	5.7	97.5	3.3	99.6	3.1	95.7	5.0	1	4
D-Cys			100.0	12.0	99.4	3.7	103.0	5.5	99.2	0.8	101.9	1.3	96.6	4.1	4	4
D-Ile + D-allo-Ile			98.6	6.4	102.5	2.4	103.3	6.7	101.6	2.8	101.2	2.4	92.8	4.5	4	4
D-Leu			98.3	16.1	103.2	3.6	102.6	2.1	104.3	2.0	100.7	0.9	90.8	4.5	4	4
D-Asn			96.6	12.1	106.5	1.9	106.9	1.9	104.5	3.4	98.1	3.0	87.4	1.8	4	4
D-Asp			98.7	14.1	102.1	7.1	104.2	7.4	102.2	4.2	99.6	2.0	93.2	3.9	4	4
D-Gln			97.4	6.2	106.5	5.2	100.4	6.7	100.3	3.6	101.0	3.2	94.5	4.7	4	4
D-Lys							101.4	5.2	96.1	6.2	101.3	2.8	101.2	2.9	40	40
D-Glu			99.7	9.1	101.5	14.2	97.2	7.8	97.7	5.5	103.9	2.1	100.0	4.0	4	4
D-Met			98.0	8.9	104.4	4.0	101.9	7.2	99.9	4.1	99.3	2.2	96.5	3.4	4	4
D-His			105.2	5.0	88.1	13.9	94.8	7.2	101.2	7.0	108.7	3.8	102.0	4.0	4	4
D-Phe	95.6	16.7	113.6	17.1	109.4	0.7	101.9	3.6	100.7	3.8	94.8	1.7	83.9	4.9	1	4
D-Arg	102.3	17.9	93.8	19.0	93.8	9.2	94.0	2.2	99.9	6.4	108.7	5.2	107.6	4.5	1	4
D-Tyr	96.9	3.9	108.3	7.4	108.8	7.3	106.0	5.3	102.1	4.0	95.8	2.5	82.2	4.6	1	1
D-Trp	99.8	2.5	97.5	4.3	107.6	7.8	103.5	5.1	102.4	4.1	99.4	1.4	89.7	4.9	1	1

a: 真度の平均値 Average of accuracy (Avg) (n=3) (%), b: 相対標準偏差 Relative standard deviation (RSD) (%), c: 検出限界 Limit of detection (LOD),

d: 定量下限 Lower limit of quantification (LLOQ)

定量限界 (LOQ) は「真度が 80 - 120 %, 精度が 20 % 以内, それ以外の濃度では真度が 85 - 115 %, 精度が 15 % 以内となる最低濃度」を設定.

付録 3-4. 食品サンプルからの D-アミノ酸回収率 (%)

アミノ酸	黒酢			キムチ			ヨーグルト		
	AEON	JHS ^a	ミツカン	甘口	イチオシ	ご飯がススム	ビフィズス	ガセリ	LB81
D-Ala	103.1	103.1	103.5	111.0	102.0	104.4	103.1	104.1	104.2
D-Ser	103.4	103.4	110.6	101.5	103.6	96.1	94.3	96.7	97.7
D-Val	105.3	94.2	103.7	102.9	107.1	102.6	101.4	103.5	104.0
D-Thr	103.4	89.6	100.1	100.2	103.6	97.6	95.9	98.4	98.6
D-Cys	93.5	84.6	77.3	44.5	8.7	12.5	102.3	104.5	108.8
D-Ile + D-allo-Ile	103.1	93.5	102.0	102.9	106.1	100.8	96.7	99.9	99.5
D-Leu	107.1	102.7	110.2	106.7	113.9	109.2	103.3	105.2	104.5
D-Asn	97.9	91.0	97.9	99.8	101.7	95.7	91.3	95.5	94.8
D-Asp	94.8	99.1	100.5	77.1	82.1	80.8	38.5	47.5	46.1
D-Gln	89.5	71.6	84.5	101.0	103.6	97.0	96.0	100.6	98.8
D-Lys	108.0	113.8	113.2	94.2	62.9	46.8	81.8	66.8	90.1
D-Glu	100.9	102.5	109.1	98.7	100.1	92.5	83.0	87.8	89.2
D-Met	104.9	102.7	110.6	105.9	112.3	103.3	103.2	105.2	105.4
D-His	93.2	88.2	86.6	104.3	113.1	96.9	71.7	74.2	75.1
D-Phe	105.9	100.0	107.8	106.3	112.7	107.3	103.4	105.6	105.1
D-Arg	106.9	92.1	103.2	96.9	82.6	65.6	75.5	76.2	81.1
D-Tyr	102.7	98.5	104.6	105.1	110.9	104.7	101.9	105.6	103.8
D-Trp	102.4	99.3	104.6	102.5	108.5	101.1	99.3	102.9	101.8

回収率は検討した全 D-アミノ酸に対して、牛乳と穀物酢で 72.1 % 以上および 89.9 % 以上.

a : 日本ヘルスシステム (JHS)