

《総合研究プロジェクト》

# 食品中の GABA 精密測定のための EACA を用いた HPLC 分析

重村 泰毅

## Evaluation of GABA Content in Foods by Using EACA as Internal Standard for HPLC Analysis

Yasutaka SHIGEMURA

### 1. 緒 言

食品や生体中の成分分析に使用される装置、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) は、非常に高性能かつ高感度なため多用されている。これらの専門的な分析装置は一般消費者用でないため、当然家電のような説明書やマニュアルは存在しない。その分析方法は、試料やその中のターゲットとなる成分によって異なる。その方法を誤れば正確に定量できず、それに気づかず不正確な測定結果を公表してしまうケースも稀ではない。正確に測定するには様々な工夫が必要であるが、特に【標準物質】についての正しい考え方、分析方法は必須である。

様々な成分が混在する食品や生体試料から特定の物質を測定する場合、そのターゲットとなる成分を高純度に単離または合成した、【標準】を用いる必要がある。その濃度が既知の標準物質を分析し、そこから求まる結果から試料中の成分の定量を行う。つまり、上皿天秤を使用する際の「分銅」のように、量がわかっているものを「標準」として目的物の重量を計測するのと同じ捉え方である (図1)。

標準物質は、外部標準法、標準添加法、内部標準法とといったいくつかの手法から計測に使用される。この中でも内部標準法は、より精密に測定できる方法と考えられている。内部標準法はターゲットと全く同じ成分ではないが、構造や成分特性に近い物質を使用する。図2のように、あらかじめ量がわかっている目的物質と内部標準を一緒に測定し、それぞれを定量する。その結果から内部標準と目的物質の比率を求めた (図2では 1:1) 後で、内部標準を試料に入れて同じ条件で測定する。その結果から、内部標準に対する試料中の目的物質に対する比率を求めることができる。試料中の内部標準に対する目的物質の比率と、あらかじめ測定した内部標準に対する既知の量の目的物質の比率から、試料中の目的物質の量を求めることができる。

理解が難しいと思うが、図2の結果から、試料中に含まれる目的物質は、単独で測定した目的物質の1.3倍となり。そのため単独で測定した目的物質の量が1gであれば、試料中の目的物質の量は1.3gである。ただし、実際の分析では、内部標準に対する目的物質の比率が1:1にならないことがある。

今回、表題にもあるとおり、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) という物質の分析を行った。その測定で精密な量を測定するために、内部標準法の導入を検討した。GABAは、食品や生体内に含まれる成分である。摂取することで、血圧上昇抑制、睡眠改善、ストレス緩和、記憶機能改善などヒト臨床試験で効果が認められている<sup>1-3)</sup>。そのため、特定保健用食品や機能性表示食品などの「健康維持に寄与」する

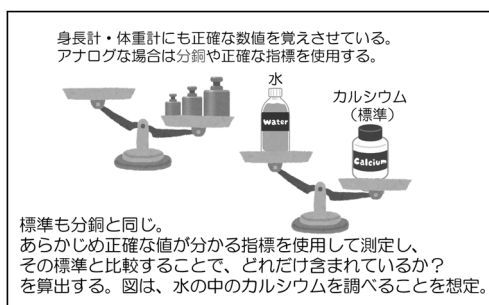


図1 標準の考え方 (例)

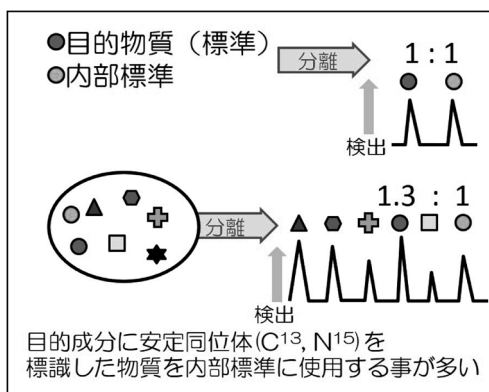


図2 内部標準法

\* 東京家政大学家政学部栄養学科/短期大学部栄養科食品機能学研究室 (Affiliation Department of Food & Nutritional Science Laboratory of Functional Food Tokyo Kasei University)

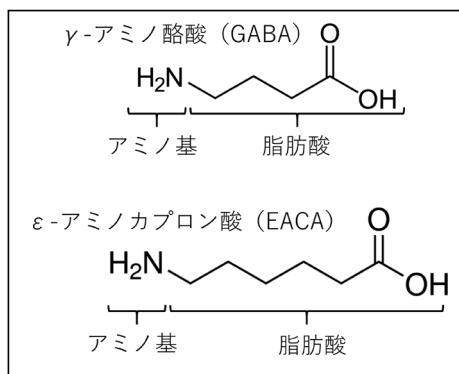


図3 GABAとEACAの構造

食品として流通している。最近では、玄米やミニトマトなどに含まれている生鮮食品としても販売されている。

GABAの構造は、アミノ基と脂肪酸炭化水素の両特徴を部分的に含む。そこで内部標準としては、ε-アミノカプロン酸 (EACA) という、GABA同様にアミノ基と炭化水素の両特徴を部分的に含む化学物質に目を付けた (図3)。これは人工合成された物質で生体内や食品には含まれない成分である。そこで、本取り組みでは、GABA測定時の内部標準試料としてEACAが利用可能か?について検討した。試験では、分析方法の検討の次に、食品キャベツを発酵させたザワークラウト<sup>4)</sup>からのGABA測定を試みた。

## 2. 方法

### 1) 試料

ザワークラウト、キャベツを千切りし、キャベツ重量の2%の食塩を添加した。ジップロック中に入れたキャベツ試料を30℃で発酵させた。発酵中、定期的に試料を採取した。

### 2) 試薬

GABA、EACA、アミノ酸混合標準液、H型、アセトニトリル (HPLC)、酢酸アンモニウム (特級)、イソチオシアン酸フェニル (フェニルイソチオシアネート: PITC) は和光純薬から購入した。

### 3) HPLCを使用したGABAとEACAの分離

GABAとEACAを分離するため、HPLCの条件設定を行った。GABAとEACAはPITC試薬で誘導化を行った<sup>5)</sup>。この誘導化は、GABAとEACAのアミノ基にPITCが反応し、フェニルチオカルバミル (PTC) 化合物がアミノ基に結合する。PTC-GABAとPTC-EACAに誘導化された化合物は、150 mM酢酸アンモニウム・5%アセトニトリル (pH 6.0) と60%アセトニトリルを溶離液Aと

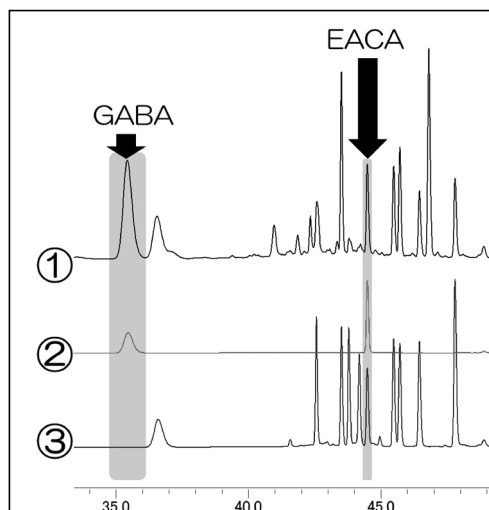


図4 GABAとEACA、そしてザワークラウトからのGABA分離

① EACAを内部標準物質として添加したザワークラウト試料の分離。②標準GABAとEACA分離。③一般的なアミノ酸にEACAを添加して分離

Bとして、SunShell C18カラム (3.5 μm 250 mm×4.6 mm, ChromaNik Technologies Inc.) を装着したHPLCで分離した。また標準のアミノ酸も同様にしてHPLCで分離し、GABAとEACAの分離ピークと重ならない条件を検討した。

### 4) ザワークラウトからのGABA分離と定量

ザワークラウト発酵前と発酵から1、2、3、4日後にザワークラウト抽出液を回収した。回収後は遠心乾燥機で乾燥後、試料を上述のPITC誘導化を行い、同様にHPLCで分離した。

## 3. 結果

実験するうえでは、GABAやEACAが分離できるか? つまりそれぞれを混合、または食品成分に混在した試料からHPLCを通して、別々に (ピークとして) 分離が可能かを調べた。そのため、まずGABAとEACAをHPLCで分離可能かを確認した (図4②)。次に、一般的なアミノ酸18種にEACAを混合してHPLCで分離後、EACAがアミノ酸ピークに重ならないかを確認した (図4①)。最後にザワークラウト試料にEACAを混合してHPLC分離後 (図4③) に、EACAを内部標準物質として (図2の要領で) 試料中のGABA量を測定した。

図4②のようにGABAとEACAは、その混合液をHPLCカラムに通した後のピークが異なった場所に検出されたため、それぞれの分離が確認できた。さらにそのEACAを、一般的な食品に含まれる18種類のアミノ酸標準

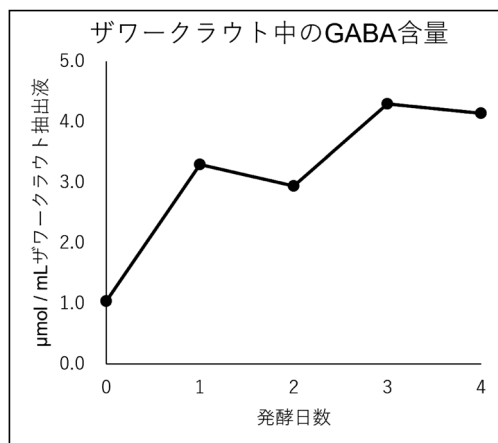


図5 ザワークラウト中の GABA 含量変化

に混合して HPLC で分離を試みたところ、EACA が他アミノ酸ピークと分かれていた (図4①)。以上の結果から EACA を食品試料に添加しても、他アミノ酸から分離検出可能であり、図2のような内部標準として使用可能であることが確認できた。

次に、ザワークラウト試料に EACA を添加して、含まれ GABA の検出を試みた。図4① HPLC の分離結果からザワークラウトに GABA が含まれていることがわかった。あらかじめ測定した GABA と EACA の濃度と比率、そしてザワークラウト試料中の GABA と EACA の比率から、GABA の量を求め、発酵時間とともに変化したその量を図5に表す。

図5に見られるように、ザワークラウト発酵時間に伴って GABA は増加する傾向をみせた。また発酵前、つまり生のキャベツの中にも GABA が含まれていることがわかる。

#### 4. 考 察

今回の研究結果から、EACA が GABA 測定における内部標準物質として有効であることがわかった。またザワークラウト発酵前の抽出液、生のキャベツには  $1 \mu\text{mol/mL}$  程度の GABA が存在するが、発酵から5日後にはその4倍以上に増かしていた。GABA がアミノ酸のグルタミン

酸の構造が変化して生成される<sup>6)</sup>。そのため、キャベツに付着している乳酸菌が繁殖し、乳酸菌によって、もしくはその繁殖による間接的な影響からキャベツ中のグルタミン酸から GABA が生成されることで増加したと考えられる。今回データに示していないが、キャベツ抽出液の pH が発酵日数とともに低下、酸性が強くなっていた。これは乳酸菌の増加を示す変化の要因と考えている。

本研究結果から、キャベツを生で食すよりも、ザワークラウトにすることで、単純に4倍量の GABA 摂取が可能である。食生活に容易に取り入れやすい体調改善方法としては、適した手段と考えられる。今後は他食品成分の内部標準物質の探索だけではなく、ザワークラウトのより効果的な GABA 増加促進方法や、他に健康増進成分の検索などを行っていく。

#### 文 献

- 1) Inoue K, Shirai T, Ochiai H, *et al.*: Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing gamma-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur J Clin Nutr* 57(3), 490–495 (2003). doi:10.1038/sj.ejcn.1601555
- 2) Hepsomali P, Groeger JA, Nishihira J, Scholey A.: Effects of oral gamma-aminobutyric acid (GABA) administration on stress and sleep in humans: A systematic review. *Front Neurosci* 14, 923 (2020). doi:10.3389/fnins.2020.00923
- 3) Yamatsu A., Nakamura U., Saddam HM., Horie N., Kaneko T., Kim M.: Intake of 200 mg/day of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) improves a wide range of cognitive functions—A randomized, double-blind, placebo-controlled parallelgroup clinical trial— 薬理と治療 48(3), 461–474 (2020).
- 4) Fleming HP, McFeeters RF, Humphries EG: A fermentor for study of sauerkraut fermentation. *Biotechnol Bioeng* 31(3), 189–197 (1988). doi:10.1002/bit.260310302
- 5) Tsushida, T., Murai, T.: Conversion of glutamic acid to  $\gamma$ -aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions. *Agr Biol Chem* 51, 2865–2871 (1987).
- 6) Shigemura Y, Kubomura D, Sato Y, Sato K.: Dose-dependent changes in the levels of free and peptide forms of hydroxyproline in human plasma after collagen hydrolysate ingestion. *Food Chem* 159, 328–332 (2014). doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.091