

《自主研究》

人工アミノ酸を使用した生体試料中オリゴ糖定量方法の開発

岩 崎 優*

Investigation of Quantitative Method of Oligosaccharides in Biological Matrix Using Artificial Amino Acid

Yu IWASAKI

1. 背景・目的

オリゴ糖は、糖質の最小単位である単糖が複数個つながったものを指す。大豆、乳、寒天などに由来するオリゴ糖は、特定保健用食品や機能性表示食品として流通している。これらはよく認知されている腸内環境へだけでなく、関節に対しても有効であることが明らかとなってきた¹⁾。したがって、摂取したオリゴ糖が直接腸管に作用するだけでなく、オリゴ糖の一部は腸管から血液中に吸収されることで、組織での生理活性を示しているのではないかと考えられる。

オリゴ糖摂取後の血液の分析には、微量な成分でも高感度に検出可能な液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS) が有用である。しかし、血液中に多量に存在する内因性の糖、アミノ酸、ペプチド、脂肪酸などは、LC-MS におけるオリゴ糖のイオン化を妨害する (イオンサプレッション)²⁾。

イオンサプレッションが起こるとオリゴ糖の定量性が大きく低下するため、そのイオン化効率の変動を補正する必要がある。その補正方法として一般的な内部標準法は、すべての分析試料に内部標準物質を一定量ずつ添加しておき、そのピーク面積の変動からイオン化効率の変動を補正する。そのため、内部標準物質は、分析する試料の中には存在しない非天然成分が望ましい。そこで本研究では、人工アミノ酸である ϵ -Aminocaproic Acid (EACA) を内部標準物質の候補とし、糖の内部標準物質として適用可能かを調べた。

2. 糖と EACA の分析条件検討

糖やアミノ酸は親水性が高いため、逆相 HPLC カラムに保持されない。また MS におけるイオン化効率も低い。そこでまずは、Glc と EACA を誘導体化し、LC-MS で検出できるかを調べた。

1) 実験操作

(1) 試料・誘導体化

グルコース (Glc) は代表的な単糖であるため、本研究においては Glc を目的成分として検討を進めた。Glc はアルデヒド基誘導体化試薬の 4-Aminobenzoic Acid Ethyl Ester (ABEE、J-ケミカル) を用い、試薬に付属のプロトコルに従って誘導体化した。EACA はアミノ基誘導体化試薬の 6-Aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl Carbamate (AccQ、Toronto Research Chemicals) を用い、既報論文に記載の手順³⁾をもとに一部に改良を加えて誘導体化を行った (図1)。

(2) 分析装置

ABEE-Glc と AccQ-EACA の分析には、LC-MS (Prominence HPLC-LCMS2020、島津製作所) を使用した。Inertsil ODS-3 HP, 3 μ m, 2.1 \times 150 mm (GL Science) カラムを使用し、0.1% 酢酸 (A 液) と 0.1% 酢酸アセトニトリル (B 液) で ABEE-Glc、AccQ-EACA を分離した。A 液と B 液

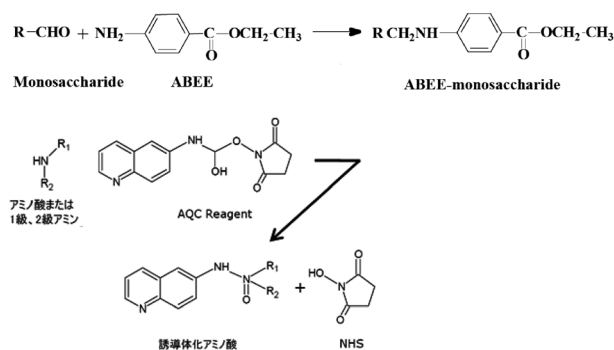
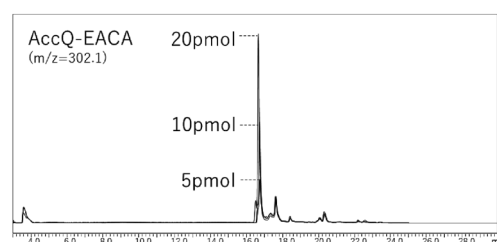


図1. ABEE 誘導体化と AccQ 誘導体化の原理^{4, 5)}

* 短期大学部栄養科 食品機能学研究室 (Junior College Department of Nutrition, Functional Foods Lab.)

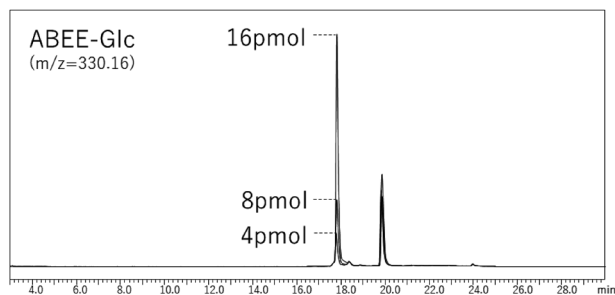


図2. ABEE-Glc と AccQ-EACA の MS クロマトグラム

のグラジエントは次に示す通りである—0–10 min ; 0%B、10–20 min ; 0–100%B、20–25 min ; 100%B、25–30 min ; 0%B。MS でのイオン化は ESI-ポジティブモードで行い、検出は選択イオンモニタリング (SIM) モードで行った。

2) ABEE-Glc と AccQ-EACA の検出

ABEE-Glc と AccQ-EACA を LC-MS で分析したところ、それぞれ分析開始から 17.8 分、16.8 分に溶出し、カラムに十分保持されていた (図2)。さらに、ABEE-Glc と AccQ-EACA のピーク面積はいずれも濃度依存的であった。この結果から、糖とアミノ酸のを逆相 LC-MS で分析する場合に ABEE と AccQ を用いた誘導体化が有効であることが確認された。

3. 糖とアミノ酸の連続誘導体化

内部標準法では、内部標準物質を一定量ずつすべての試料に添加しておき、目的成分を誘導体化し、LC-MS で分析する。そこで今回は、Glc と EACA の混合溶液で Glc の ABEE 化と EACA の AccQ 化を連続的にを行い、ABEE-Glc と AccQ-EACA が MS で検出できるかを調べた。

1) 実験操作

Glc と EACA を混合し、① ABEE→AccQ の順と、② AccQ→ABEE の順の 2 パターンで誘導体化を行った。Glc と EACA をそれぞれ単独で誘導体化した試料も用意した。誘導体化後の試料は、LC-MS を用い先述と同じ条件で分析した。

2) 結果

図3に誘導体化した試料の MS クロマトグラムを示した。ABEE→AccQ の順で誘導体化した①の試料では、ABEE-Glc がはっきりと検出され、そのピーク面積は 2.708×10^7 であった。AccQ→ABEE の順で誘導体化した②からも ABEE-Glc のピークが検出されたが、その面積は 2.161×10^6 であり、①に対して 1/12 程度であった。この結果から、糖の ABEE 誘導体化反応は、AccQ 誘導体

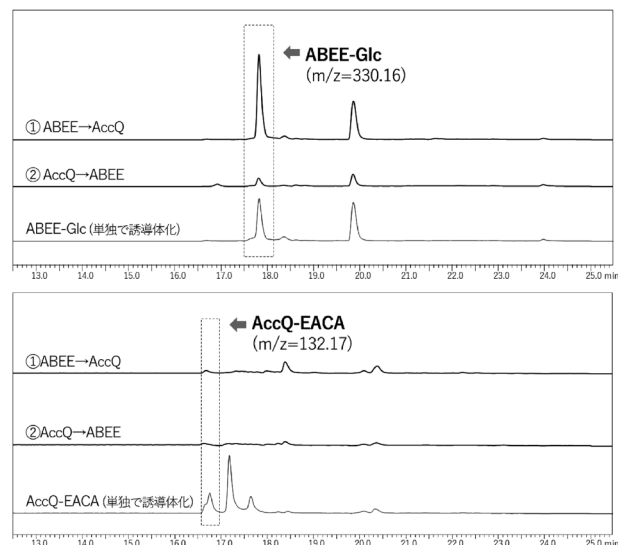


図3. ABEE と AccQ-Glc の連続誘導体化後の Glc と EACA 検出

化に使用する試薬によって阻害されることが示唆された。

一方 EACA は、単独で誘導体化した場合は AccQ-EACA が検出されたが、AccQ 誘導体化の前後に ABEE 誘導体化操作した試料①②では AccQ-EACA がほとんど検出されなかった。このことから、ABEE 誘導体化反応は、AccQ 誘導体化反応を阻害することに加え、AccQ-EACA を分解する可能性が考えられた。

4. ま と め

本研究では LC-MS による糖の正確な定量方法として、人工アミノ酸である EACA が適用できるかを検討した。糖とアミノ酸はそれぞれ異なる誘導体化が必要であるため、その 2 つの誘導体化反応を連続的に行った後に糖と EACA の誘導体化物が安定していることが、EACA を糖の内部標準物質として利用できる条件となる。しかし、Glc の ABEE 化はその前の AccQ 誘導体化反応によって妨げられ、EACA の AccQ 化も ABEE 誘導体化反応によって妨げられることがわかった。今回の結果から、人工アミノ酸 EACA は糖の内部標準物質としては不適と判断した。

血液中のオリゴ糖を定量する際には EACA 以外の内部標準物質が必要である。Glc の 6 か所の炭素原子 ^{13}C がすべて安定同位体標識された $^{13}\text{C}_6\text{-Glc}$ は、天然にほとんど存在せず、内部標準物質としての適用が期待できる。一方で、 $^{13}\text{C}_6\text{-Glc}$ は通常の Glc と化学的性質が同じであるため、血液中に多量に含まれる Glc が $^{13}\text{C}_6\text{-Glc}$ のイオン化を強く抑制することが懸念される。今後、この $^{13}\text{C}_6\text{-Glc}$ を含め、安定同位体標識糖を用いたオリゴ糖の定量方法を検討し、血中オリゴ糖の正確な定量方法の確立を目指したい。

文 献

- 1) Yamagishi, Y., Someya, A., Imai, K., Nagao, J., and Nagaoka, I.: Evaluation of the anti-inflammatory actions of various functional food materials including glucosamine on synovial cells. *Molecular Medicine Reports* 16, 1353–135 (2017).
- 2) Dietrich A. V, Lori L. J.: Ion suppression: A major concern in mass spectrometry. *LCGC North America*-05-01-2006, 24 (5), 498–510 (2006).
- 3) Ejima, A., Nakamura, M., Suzuki, A. Y., and Sato, K.: Identification of food-derived peptides in human blood after ingestion of corn and wheat gluten hydrolysates. *J. Food Bioact.* 2, 104–111 (2018).
- 4) 株式会社 J-Chemical : 糖標識化キット ABEE Labeling Kit, https://www.cosmobio.co.jp/support/technology/document/JCM_GLYCOANALYSIS_NEWS-1.pdf.
- 5) Waters : AccQ・Tag メソッド, https://www.waters.com/waters/ja_JP/AccQ%E2%80%A2Tag-Ultra%2C-AccQ%E2%80%A2Tag-and-Pico%E2%80%A2Tag-Columns/nav.htm?locale=ja_JP&cid=1000897