

液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計 (LC-QTOF-MS) を用いた アミノ酸の非誘導体化分析法の検討

松本 健志*, 岸 大暉*, 榎本 康敬*, 野口 大*

Amino acids analysis without derivatization by using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometer (LC-QTOF-MS)

MATSUMOTO Tsuyoshi*, KISHI Daiki*, ENOMOTO Yasuyuki* and NOGUCHI Hiroshi*

*Tokyo Customs Laboratory 2-7-11 Aomi, Koto-ku, Tokyo, 135-8615 Japan

Amino acids are usually analyzed by the post-column-derivatization method or pre-column-derivatization method using an automated amino acid analyzer or general HPLC. Recently, LC-MS/MS operating in the selected reaction monitoring (SRM) mode has been used for amino acids analysis because a MS (mass spectrometer) can detect amino acids without derivatization and the SRM mode has high selectivity and sensitivity. However, this method has disadvantages; (1) it is required to optimize SRM parameters for individual compounds and (2) it is impossible to measure compounds for which SRM parameters are not optimized. The total ion monitoring (TIM) mode using LC-QTOF-MS has the advantages that; (1) there is no need to optimize MS parameters for individual compounds and (2) the acquired data can be used for non-target analysis. In this study, we examined an analysis method for underivatized amino acids by using LC-QTOF-MS. As a result of the measurement of 20 standard amino acid samples, the measured exact masses were in close agreement with the calculated exact mass of $[M+H]^+$ and the repeatability of peak area intensities obtained from extracted ion chromatography (EIC) of $[M+H]^+$ were generally less than 5% in relative standard deviation, except for glycine and L-alanine. Furthermore, the coefficients of determination (R²) of the calibration curve ranged from 0.98-1.00 in the concentration range of 1-20 $\mu\text{mol/L}$.

1. 緒 言

アミノ酸の分析には、従来、アミノ酸自動分析計¹⁾や高速液体クロマトグラフを用いたポストカラム誘導体化法^{2,4)} (ポストラベル化法) 及びプレカラム誘導体化法^{5,6)} (プレラベル化法) が主に用いられてきたが、近年、液体クロマトグラフ (LC) とタンデム四重極型質量分析計を組み合わせた LC-MS/MS による選択反応モニタリング (SRM) 測定を用いた手法が報告されている⁷⁻¹⁰⁾。この手法は、アミノ酸を誘導体化することなく検出することができ、クロマトグラフィーにおける分離が不十分であっても互いに影響を受けることなく高選択的に測定ができるといった利点があるが、一方で、①全ての測定対象化合物に対して個別に SRM 条件を設定する必要がありメソッド開発が難しい、②事前に SRM 条件を設定していない化合物の測定ができない、といった欠点もある¹¹⁾。

LC に接続される質量分析計としては、タンデム四重極型質量分析計のほかに、四重極飛行時間型質量分析計 (QTOF-MS) がある。QTOF-MS は、四重極型質量分析計と飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) が組み合わさったハイブリッド質量分析計であり、カチオン付加分子、アニオン付加分子、プロダクトイオン等の精密質量を測定できるため、分子の組成や構造推定等の定性分析に主に用いられ、タンデム四重極型質量分析計と比較して定量性やダイナミ

ックレンジ等が劣るとの理由から、従来、定量分析にはあまり利用されてこなかった。しかしながら、近年の装置性能の向上に加えて、QTOF-MS による全イオンモニタリング (TIM) 測定 (四重極部では全イオンを通過させ、コリジョンエネルギーを 0 V に設定し、通常の TOF-MS と同じように行う測定) には、①化合物毎の測定条件の設定が不要である、②事前に想定していなかった化合物の有無の確認や組成の推定等、網羅的な分析 (ノンターゲット分析) が可能である、という利点があるため、定量分析にも利用されるようになってきている。

本研究では、実試料中のアミノ酸分析の前段階として、20 種類の標準アミノ酸を用い、液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計 (LC-QTOF-MS) の全イオンモニタリング測定によるアミノ酸の非誘導体化分析法について検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 試薬

アミノ酸混合標準液 H 型 (富士フィルム和光純薬)

成分: L-アスパラギン酸	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L-トレオニン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L-セリン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$

* 東京税関業務部

〒135-8615 東京都江東区青海 2-7-11

L-グルタミン酸	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L(-)-プロリン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
グリシン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L-アラニン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L(-)-シスチン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L-バリン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L-メチオニン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L-イソロイシン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L-ロイシン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L-チロシン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L-フェニルアラニン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L-リシン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L-ヒスチジン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
L-アルギニン	2.50 $\mu\text{mol/mL}$
塩化アンモニウム	2.50 $\mu\text{mol/mL}$

L-ヒドロキシプロリン (旧和光純薬工業)

L(+)-シトルリン (ACROS ORGANICS)

L-オルニチン-塩酸塩 (関東化学)

ギ酸 (富士フィルム和光純薬)

ギ酸アンモニウム (Honeywell / Fluka)

アセトニトリル (関東化学)

塩酸 (純正化学)

2.2 装置構成及び測定条件

2.2.1 装置構成

LC-QTOF-MS の装置の構成は、以下のとおり (いずれも Agilent Technologies)。

Agilent 1290 Infinity II パイアルサンプラ (G7129B)

Agilent 1290 Infinity II フレキシブルポンプ (G7105A)

Agilent 1290 Infinity サーモスタット付カラムコンパートメント (G1316C)

Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212B)

Agilent 6530 四重極飛行時間型質量分析計 (G6530B)

Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソース

2.2.2 LC 条件

カラムの製造販売メーカーであるインタクト株式会社が公開している技術情報¹²⁾を参考に、以下の条件で測定した。

カラム	: Intrada Amino Acid (3 mm \times 100 mm) (インタクト)
移動相 A	: アセトニトリル / ギ酸 = 100 / 0.3 (v/v)
移動相 B	: 100 mM ギ酸アンモニウム水溶液 / アセトニトリル = 80 / 20 (v/v)
グラジエント条件	: 20 % B (0-6 min) 20-100 % B (6-18 min) 100 % B (18-24 min)
流量	: 0.45 mL/min
カラム温度	: 34 $^{\circ}\text{C}$
注入量	: 5 μL

2.2.3 QTOF-MS 条件

イオン化モード	: ESI, positive
ガス温度	: 300 $^{\circ}\text{C}$
ガス流量	: 11 L/min
ネブライザ圧力	: 50 psi
シースガス温度	: 350 $^{\circ}\text{C}$
シースガス流量	: 11 mL/min
キャピラリー電圧	: 3500 V
ノズル電圧	: 0 V
フラグメンタ電圧	: 120 V
スキマー電圧	: 65 V
取り込みモード	: MS (四重極を使用しない TOF モード)
m/z 範囲	: 66-350
取り込みレート	: 1 spectra/sec
質量補正	: なし

2.3 実験

2.3.1 検量線用標準アミノ酸溶液の調製

L-ヒドロキシプロリン, L(+)-シトルリン及び L-オルニチンの濃度 2.50 $\mu\text{mol/mL}$ の 0.1M 塩酸溶液をそれぞれ調製した。これらの溶液及びアミノ酸混合標準液 H 型 (富士フィルム和光純薬) を用い、各アミノ酸濃度が 1, 2, 5, 10, 15, 20 及び 40 $\mu\text{mol/L}$ になるように 0.1M 塩酸で適宜希釈したものを検量線用標準アミノ酸溶液とし、以下の試験に用いた。

2.3.2 LC-QTOF-MS における各アミノ酸の保持時間と検出イオン種の確認

濃度 15 $\mu\text{mol/L}$ の検量線用標準アミノ酸溶液を LC-QTOF-MS により測定し、各アミノ酸の保持時間及び検出されるイオン種を確認した。

2.3.3 ピーク面積強度の繰返し性の確認

濃度 1, 2, 5, 10, 15, 20 及び 40 $\mu\text{mol/L}$ の検量線用標準アミノ酸溶液を 5 回ずつ、非連続で繰返し測定を行い、得られるピーク面積強度の繰返し性を確認した。

2.3.4 検量線の直線性の確認

上記 2.3.3 で行った 5 回測定のピーク面積強度の平均値を用いて検量線を作成し、その直線性を確認した。

3. 結果及び考察

3.1 LC-QTOF-MS におけるアミノ酸の保持時間と検出イオン種

濃度 15 $\mu\text{mol/L}$ の検量線用標準アミノ酸溶液を LC-QTOF-MS により測定した結果、全てのアミノ酸において、プロトン付加分子 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) の計算精密質量とほぼ一致する測定精密質量が得られた。各アミノ酸の保持時間、分子情報、計算精密質量、測定精密質量等を Table 1 に示す。また、得られた全イオン電流クロマトグラム (TICC) 及び各アミノ酸の $[\text{M}+\text{H}]^+$ の m/z による抽出イオンクロマトグラム (EIC) (抽出質量幅: $m/z \pm 50$ ppm) を Fig.1-1 及び Fig.1-2 に示す。

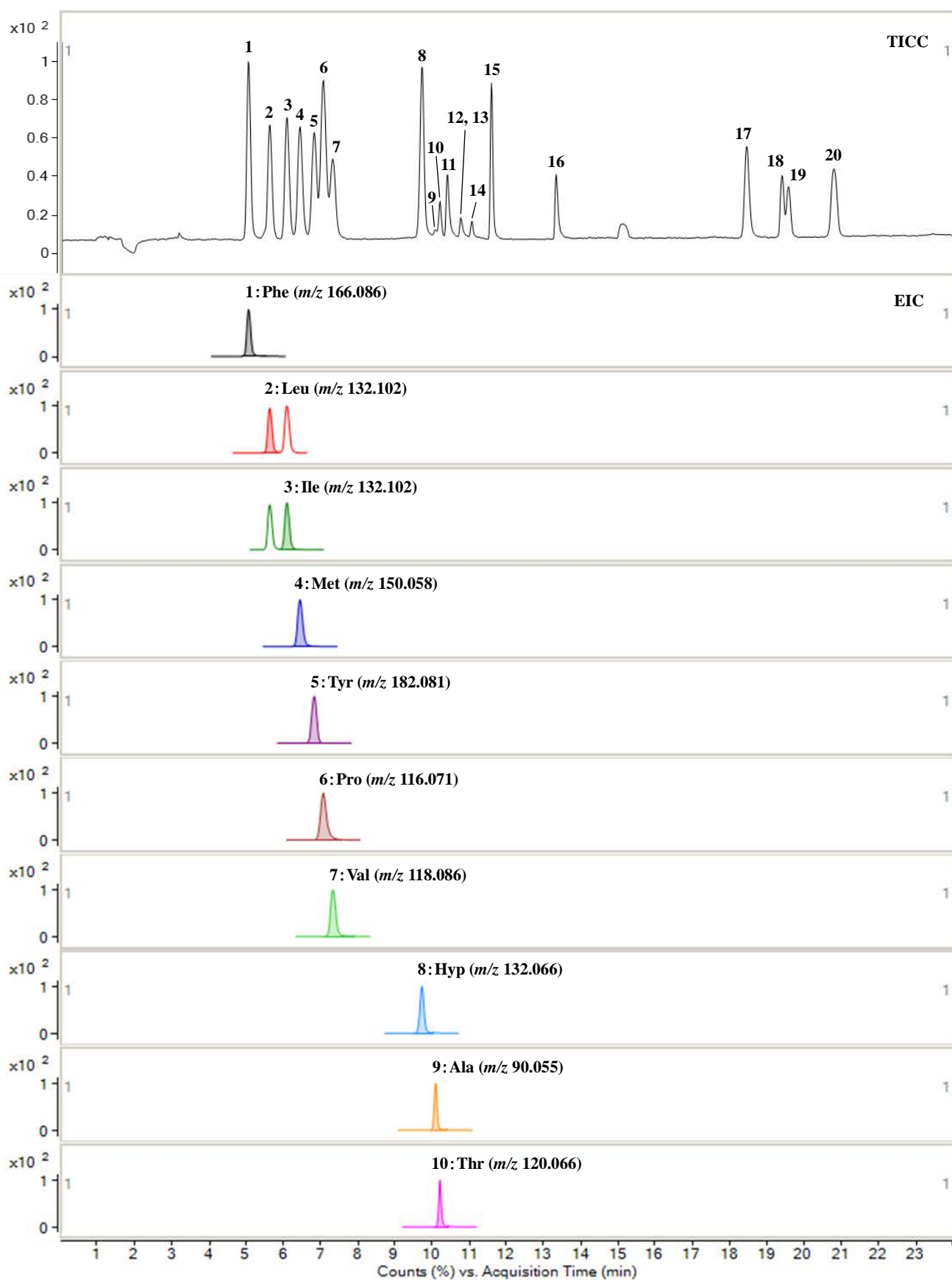
Table 1 Results of LC-QTOF-MS analysis of underivatized amino acids showing elution order, retention time, measured accurate mass and so on.

Elution order	Retention time (min)	Amino acid	Symbol (3-letter)	Formula	Molecular Weight	Calculated exact mass of [M+H] ⁺	Measured accurate mass (<i>m/z</i>)	Mass error (mDa)
1	5.1	L-Phenylalanine	Phe	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.19	166.0868	166.0862	0.6
2	5.6	L-Leucine	Leu	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.18	132.1025	132.1022	0.3
3	6.1	L-Isoleucine	Ile	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.18	132.1025	132.1021	0.4
4	6.5	L-Methionine	Met	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149.21	150.0589	150.0586	0.3
5	6.8	L-Tyrosine	Tyr	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.19	182.0817	182.0814	0.3
6	7.1	L(-)-Proline	Pro	C ₅ H ₉ NO ₂	115.13	116.0712	116.0707	0.5
7	7.3	L-Valine	Val	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.15	118.0868	118.0863	0.5
8	9.7	L-Hydroxyproline	Hyp	C ₅ H ₉ NO ₃	131.13	132.0661	132.0657	0.4
9	10.1	L-Alanine	Ala	C ₃ H ₇ NO ₂	89.09	90.0555	90.0552	0.3
10	10.2	L-Threonine	Thr	C ₄ H ₉ NO ₃	119.12	120.0661	120.0656	0.5
11	10.4	L-Glutamic Acid	Glu	C ₅ H ₉ NO ₄	147.13	148.0610	148.0607	0.3
12	10.8	Glycine	Gly	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	76.0399	76.0398	0.1
13	10.8	L-Aspartic Acid	Asp	C ₄ H ₇ NO ₄	133.10	134.0453	134.0447	0.6
14	11.1	L-Serine	Ser	C ₃ H ₇ NO ₃	105.09	106.0504	106.0502	0.2
15	11.6	L(+)-Citulline	Cit	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	175.19	176.1035	176.1031	0.4
16	13.3	L(-)-Cystine	(Cys) ₂	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂	240.30	241.0317	241.0311	0.6
17	18.5	L-Histidine	His	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.16	156.0773	156.0771	0.2
18	19.4	L-Lysine	Lys	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.19	147.1133	147.1129	0.4
19	19.6	L-Ornithine	Orn	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	132.16	133.0977	133.0972	0.5
20	20.8	L-Arginine	Arg	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.20	175.1195	175.1188	0.7

Table 2 Relative standard deviation (%) of peak area obtained by five measurements and coefficient of determination (R²) of calibration curves.

(Extracted mass range : *m/z* ([M+H]⁺) ± 50 ppm)

Elution order	Amino acid	RSD(%, n=5) of each concentration							Coefficient of determination (R ²) of calibration curves			
		1 μmol/L	2 μmol/L	5 μmol/L	10 μmol/L	15 μmol/L	20 μmol/L	40 μmol/L	1-10 μmol/L (4 points)	1-15 μmol/L (5 points)	1-20 μmol/L (6 points)	1-40 μmol/L (7 points)
1	Phe	1.6	3.2	3.5	2.7	3.3	3.2	3.0	0.9985	0.9951	0.9944	0.9842
2	Leu	1.6	2.1	3.1	2.4	3.2	2.3	2.1	0.9987	0.9946	0.9934	0.9845
3	Ile	1.5	1.9	3.1	2.5	3.9	1.9	3.6	0.9988	0.9938	0.9932	0.9792
4	Met	1.7	3.2	2.9	2.8	3.2	2.0	2.2	0.9967	0.9944	0.9925	0.9808
5	Tyr	1.2	2.1	3.3	2.2	2.1	2.8	3.5	0.9939	0.9873	0.9832	0.9647
6	Pro	2.0	2.5	2.4	2.4	2.3	2.0	1.8	0.9962	0.9937	0.9924	0.9810
7	Val	0.9	1.9	3.9	2.8	2.7	3.0	2.1	0.9999	0.9966	0.9924	0.9750
8	Hyp	3.6	3.6	3.1	2.3	2.6	3.4	3.4	0.9891	0.9875	0.9845	0.9711
9	Ala	6.5	8.0	5.3	6.9	4.9	7.0	7.7	0.9998	0.9973	0.9947	0.9876
10	Thr	3.5	2.3	3.2	3.4	3.8	5.1	2.7	0.9996	0.9995	0.9994	0.9985
11	Glu	0.8	3.2	3.5	3.3	4.4	4.4	3.1	0.9995	0.9996	0.9995	0.9920
12	Gly	23.8	7.7	9.0	6.2	7.3	5.4	6.8	0.9973	0.9908	0.9839	0.9677
13	Asp	4.9	3.2	3.6	1.5	3.1	4.9	4.4	0.9999	1.0000	1.0000	0.9975
14	Ser	3.4	3.1	3.7	3.3	5.2	4.1	8.5	0.9998	0.9999	0.9999	1.0000
15	Cit	4.3	4.2	2.6	1.8	2.4	1.8	1.8	0.9943	0.9876	0.9831	0.9588
16	(Cys) ₂	3.2	3.5	3.8	3.2	2.6	2.9	3.2	0.9968	0.9974	0.9987	0.9956
17	His	4.3	4.4	4.1	3.8	3.6	2.7	1.0	0.9959	0.9924	0.9904	0.9767
18	Lys	4.1	4.1	5.6	3.0	2.6	2.5	1.6	0.9807	0.9929	0.9961	0.9904
19	Orn	1.8	3.8	4.0	3.4	3.6	3.4	1.9	0.9968	0.9988	0.9988	0.9857
20	Arg	4.0	4.1	5.3	3.0	4.1	2.6	1.8	0.9986	0.9920	0.9835	0.9387

Fig.1-1 TICC and EIC of amino acid standards (Elution order: 1-10, Extracted mass range : m/z ($[M+H]^+$) ± 50 ppm).

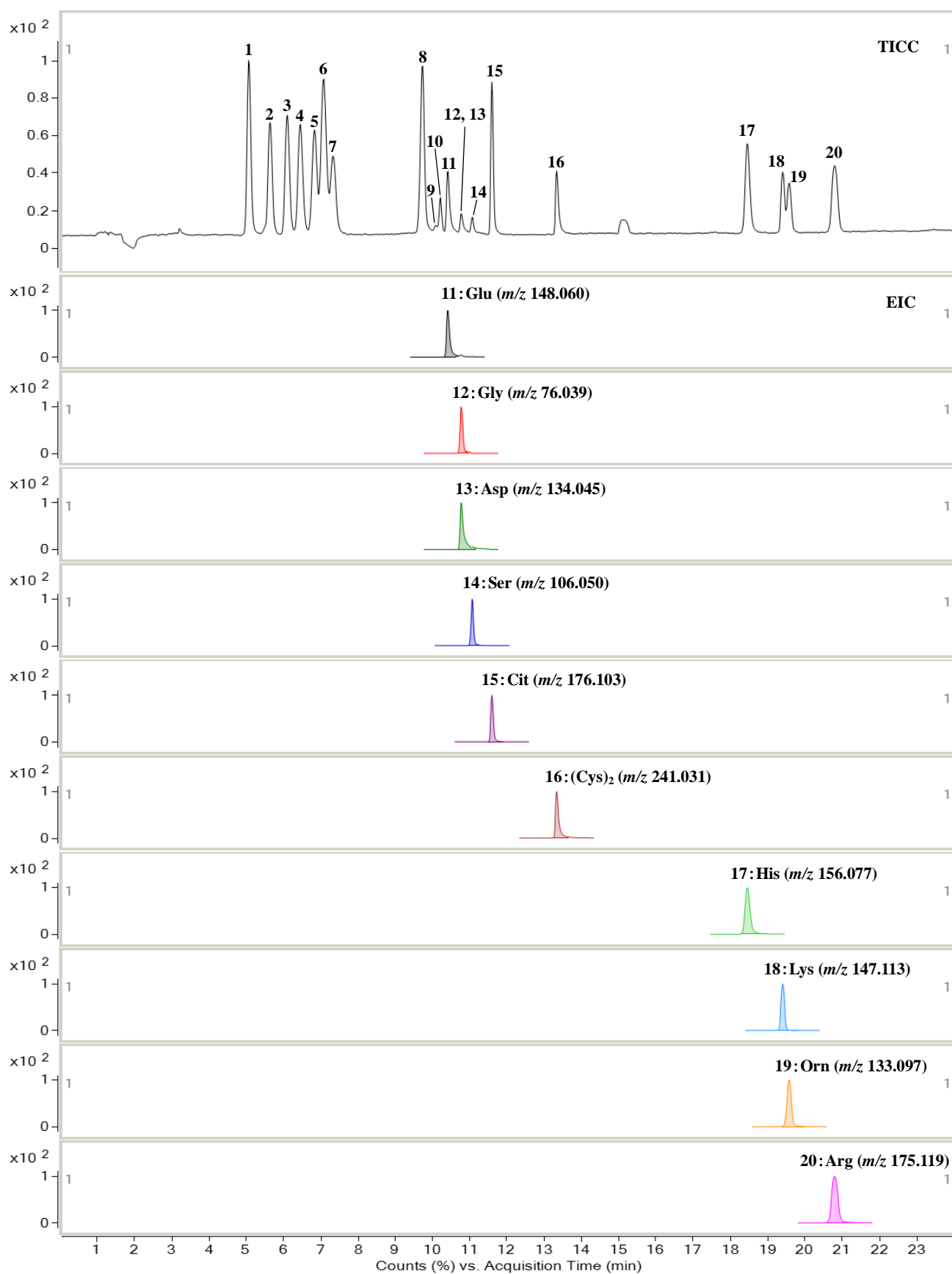


Fig.1-2 TICC and EIC of amino acid standards (Elution order: 11-20, Extracted mass range : m/z ($[M+H]^+$) ± 50 ppm)

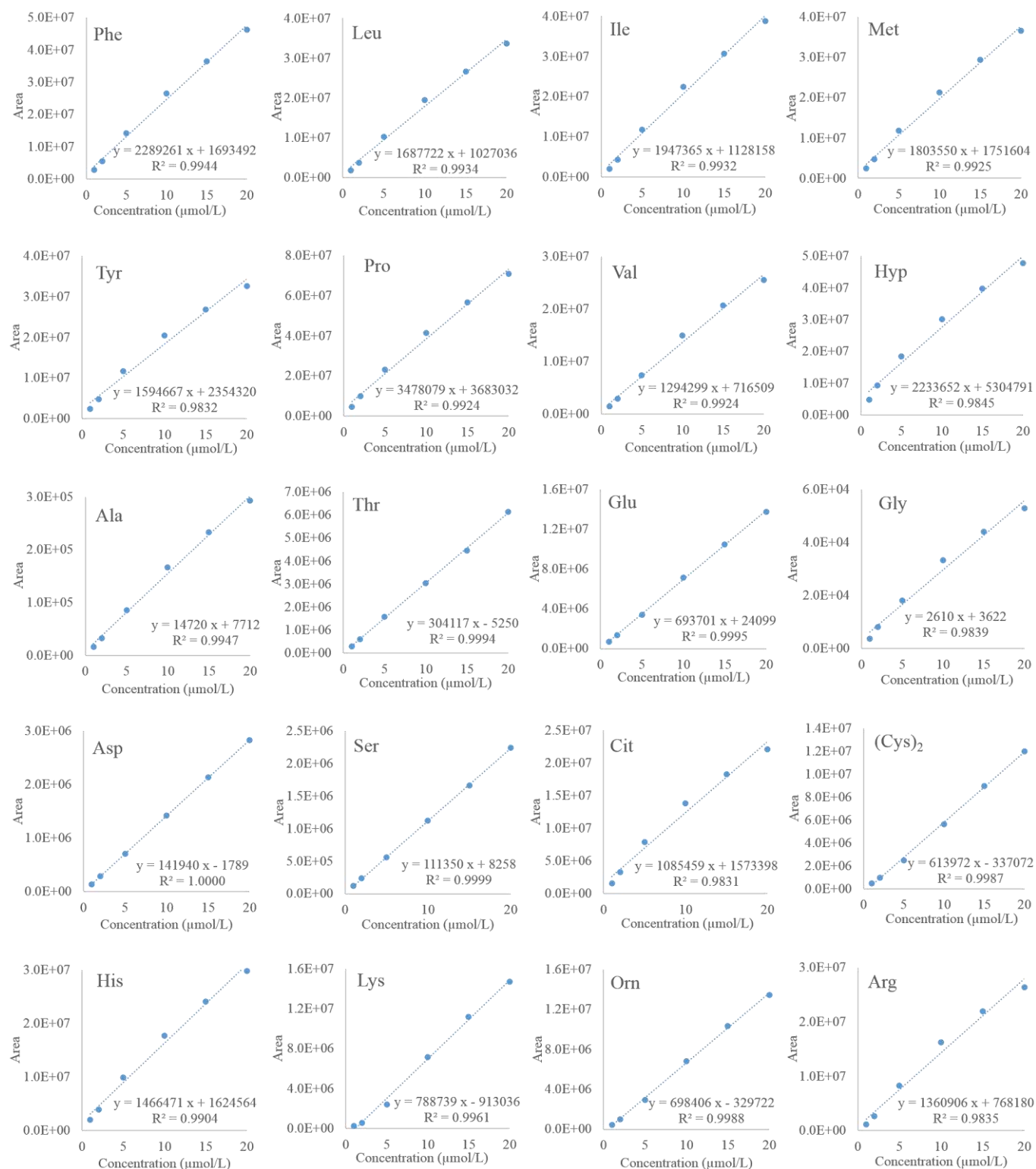


Fig.2 Calibration curves of 20 amino acid standards (Concentration range: 1-20 μmol/L).

3.2 ピーク面積強度の繰返し性

各アミノ酸の各濃度における $[M+H]^+$ のEIC（抽出質量幅： $m/z \pm 50$ ppm）から得られたピーク面積強度の相対標準偏差（RSD（%）， $n=5$ ）は，グリシンとL-アラニンを除き，概ね5%未満であった（Table 2）．グリシンとL-アラニンは，その他のアミノ酸と比較してピーク面積強度が弱く，S/N比が小さいため，相対標準偏差が大きくなったと考えられる（Fig.2のGly及びAlaの検量線参照）．

3.3 検量線の直線性

ピーク面積強度の5回繰返し測定の平均値から，直線回帰により検量線を作成した．決定係数 R^2 の値をTable 2に示す．全てのアミノ酸の1-20 $\mu\text{mol/L}$ の濃度範囲において，検量線の R^2 は0.98-1.00であったが，高濃度側を含めるほど直線性が低くなる傾向が観察された．濃度40 $\mu\text{mol/L}$ まで含めた検量線では，全20種類のアミノ

酸のうち，8種類のアミノ酸において R^2 が0.98未満となった．全アミノ酸の濃度1-20 $\mu\text{mol/L}$ の範囲における検量線をFig.2に示す．

4. 要 約

LC-QTOF-MSを用いた全イオンモニタリング測定により，20種類の標準アミノ酸を誘導体化せずに測定した結果，全てのアミノ酸において，プロトン付加分子 $[M+H]^+$ の計算精密質量とほぼ一致する測定精密質量が得られ，アミノ酸の定性が可能であった．また，抽出イオンクロマトグラフ（EIC）から得られたピーク面積強度は，相対標準偏差として概ね5%未満の繰返し性を有し，濃度1-20 $\mu\text{mol/L}$ の範囲において，直線回帰による検量線の決定係数 R^2 が0.98-1.00の値を示したことから，定量分析における有用性も示唆された．今後，実試料を用いた実用性の検証が必要である．

文 献

- 1) 「分析機器の手引き」2017編集委員会（編）：“分析機器の手引き2017”，pp.76 (2017)，（一般社団法人日本分析機器工業会）
- 2) 日本食品分析センター：JFRLニュース，vol.6, No.26, Dec.2019
http://www.jfrl.or.jp/storage/file/news_vol6_no26.pdf（URL：2020年3月18日確認）
- 3) 文部科学省科学技術・学術政策局政策課資源室（監修），安井明美・渡邊智子・中里孝史・淵上賢一（編）：“日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル・解説”，pp.175-190 (2016)，（建帛社）
- 4) 島津製作所：LCtalk53号INTRO改訂版 アミノ酸の分析法
<http://www.an.shimadzu.co.jp/hplc/support/lib/lctalk/53/53intro.htm>（URL：2020年3月18日確認）
- 5) JASCO：HPLCを用いたアミノ酸分析
<http://www.jasco.co.jp/jpn/technique/topics/amino/HPLC.html>（URL：2020年3月18日確認）
- 6) 八木潤，五十嵐智大，片山貴之：関税中央分析所報，**57**, 67-74 (2017)
- 7) 清野朱美，廣岡青央：京都市産業技術研究所研究報告，**5**, 96-100 (2015)
- 8) 瀬戸山央，橋本知子：神奈川県立産業技術総合研究所研究報告，**23**, 48-50 (2017)
- 9) 中島日出夫，成澤朋之：埼玉県立産業技術総合センター研究報告，**16**, 30-34 (2018)
- 10) 高野淑織，力石嘉人，大河内直彦：Researches in Organic Geochemistry，**31**, 1-17 (2015)
- 11) 志田（齊藤）静夏：食品・食品添加物研究誌FFIジャーナル，**.224**, 137-143 (2019)
- 12) インタクト株式会社：Intrada Amino Acid 技術情報 No.TI1770E
<http://imtakt.com/TecInfo/TI1770E.pdf>（URL：2020年3月18日確認）