

γ-アミノ酪酸の分析条件検討

齋藤 遼*

機能性成分として注目を集めている γ-アミノ酪酸(以下 GABA)の汎用高速液体クロマトグラフによる分析検討を行った。従来当センターで行っていた 9-フルオレメチルクロロギ酸(以下 FMOC)を用いたアミノ酸誘導体化法ではアミノ酸混合標準液(18 種含有)中のアミノ酸と GABA の分離が困難であったためアミノ酸誘導体化法を検討したところ、o-フタルアルデヒド(以下 OPA)による誘導体化法で分離が可能となった。

1 はじめに

当センターでは、高速液体クロマトグラフ(以下 HPLC)を活用し、タンパク質、アミノ酸、有機酸等の分析を行ってきた。GABA は非タンパク質構成アミノ酸の一種であり、動物、植物など自然界に広く存在している。哺乳類では抑制性の神経伝達物質としての機能をもっており、血圧降下作用や抗ストレス、睡眠の質の向上などの効果が示唆されていることから現在でも特定健康保健用食品や機能性表示食品中の機能性成分として利用されている¹⁾。このような機能性成分は高齢化が急速に進む丹後地域でも注目すべき成分であり、丹後地域産食品に含まれる GABA 量を分析し、高含量食品等を探索していくことは重要と考えた。今回はまずその分析条件について検討を行うこととした。

2 試薬・機器

2.1 試薬

アミノ酸標準液 H(アンモニア、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-シスチン(1.25 mM)、L-グルタミン酸、グリシン L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-バリン、記載のないものは 2.5 mM)(Thermo Fisher Scientific)、GABA、蒸留水(HPLC 用)、FMOC(Sigma-Aldrich)、ホウ酸(ナカライテスク(株)、特級)、リン酸(ナカライテスク(株)、特級)、メタノール(HPLC 用)、水酸化ナトリウム(ナカライテスク(株)、特級)、OPA(生化学用)、リン酸水素二ナトリウム、N-アセチルシステイン(以下

NAC)、アセトニトリル(HPLC 用)、リン酸(ナカライテスク(株)、特級)、リン酸二水素ナトリウム、特に記載がない場合は富士フィルム和光純薬(株)の特級試薬を用いた。

2.2 機器

HPLC: Alliance e2695(Waters)、低温インキュベーター BITEC-300B((株)島津理化)、卓上遠心機 MCF-2360(LMS)、攪拌機 Vortex Genie2(Scientific Industries)、電子天秤 1702MP8(Sartorius)

3 方法

3.1 アミノ酸の誘導体化

本研究では当センターの従来法である FMOC と OPA による 2 種のアミノ酸誘導体化法を検討した。

FMOC による誘導体化: 0.5 M ホウ酸緩衝液(pH10.2、NaOH で調整)0.4ml と試料 0.4ml を混合し、0.1%(w/v) FMOC/アセトニトリル溶液 0.4ml を加え、攪拌した(1 min)。その後、加熱により反応を停止させた(50°C、10 min)。

OPA による誘導体化: 暗所で遮光したマイクロチューブに 80 mM NAC 0.6 ml、試料 0.2ml、120 mM OPA 0.4ml の順に混合し、軽く攪拌後反応させた(35°C、10 min)。OPA、NAC は 200 mM ホウ酸緩衝液(pH10.2)、試料は 0.1%(w/v)リン酸に溶解させた。

3.2 HPLC による分析

誘導体化反応後の溶液を 0.45 μm メンブランフ

* 企画連携課 技師

フィルターでろ過したものを試料とし、HPLCに供した。HPLC 関連装置およびカラムは Waters 社製を使用し、下記の条件で分析を行った。なお、試料分析の前には同分析条件でカラム平衡化を行った。

分析条件(FMOC 誘導体化アミノ酸)

装置: Alliance e2695

カラム: AccQ•Tag 3.9×150 mm

ガードカラム: Nova-Pak C₁₈ 3.9×20 mm

検出器: 2998 PDA 検出器 (検出波長: 262 nm)

試料注入量: 10 μL

カラム温度: 45°C

流速: 1.0 ml/min

送液条件: 表 1 のとおり

表 1 グラジエント条件(FMOC 誘導体化アミノ酸)

時間 (min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)	移動相 C (%)
0	95	5	0
20	85	15	0
30	60	40	0
48	40	60	0
48.1	0	60	40
51	95	5	0
60	95	5	0

移動相 A: 100 mM 酢酸 Na 緩衝液+ 5.6 mM トリエチルアミン(pH6.8)

移動相 B: アセトニトリル

移動相 C: メタノール

分析条件(OPA 誘導体化アミノ酸)

装置、カラム、試料注入量は上記と同様

検出器: 2475 FLR 検出器 (Ex: 350 nm, Em: 450 nm)

カラム温度: 40°C

流速: 2.0 ml/min

送液条件: 表 2 のとおり

3. 3 GABA 標準液の調製

GABA 10.3 mg を秤量後 10 ml メスフラスコを用いて 0.1%リン酸で定容し、標準原液とした(濃度: 10 mM)。この原液を適宜希釈し、10、50、100、

250、500 μM の標準試料を作製した。

表 2 グラジエント条件(OPA 誘導体化アミノ酸)

時間 (min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	85	15
20	50	50
30	50	50
35	5	95
40	85	15

移動相 A: 10 mM リン酸 Na 緩衝液(pH6.8)

移動相 B: 10 mM リン酸 Na 緩衝液(pH6.8): アセトニトリル=60:40

3. 4 OPA 誘導体化 GABA の経時変化

GABA を前述の方法で誘導体化し、HPLC のサンプルクーラー内に遮光下で静置した(15°C、0-3 h)。

4 結果

4. 1 GABA 分離条件の検討

初めに当センターで従来行っていたアミノ酸分析手法により GABA の分析を行った。カラムや流速、グラジエント等の条件を検討したがアミノ酸標準液中のプロリン(Pro)との分離が困難であった(図 1)。

次に誘導体化試薬の検討を行ったところ OPA による誘導体化アミノ酸の分析により GABA と標準アミノ酸の分離が可能となった(図 2)。以後の実験では誘導体化に OPA を使用することとした。

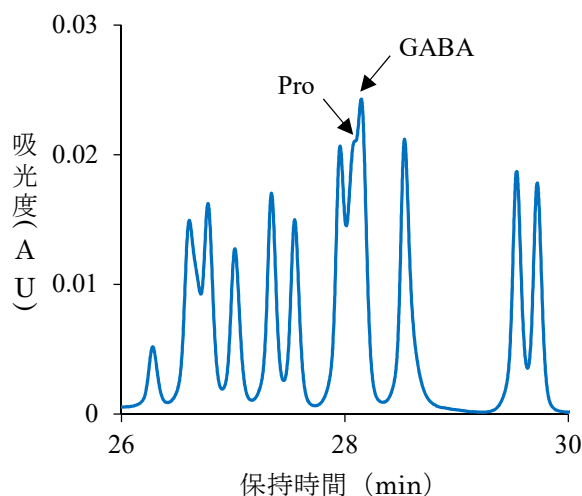


図 1 FMOC 誘導体化 GABA の分析
試料: 50 μM GABA、50 μM アミノ酸標準液

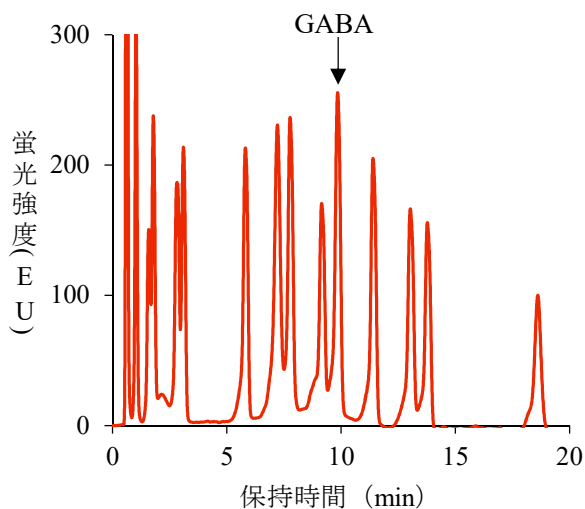


図2 OPA 誘導体化 GABA の分析
試料: 50 μM GABA、50 μM アミノ酸標準液

4.2 OPA 誘導体化 GABA の経時変化

GABA の検量線作製の際、4 試料 (GABA 濃度: 10、50、100、250、500 μM) を同時に誘導体化し、サンプルクーラーで保管した。その後オートサンプラーを用いて分析を行い、検量線を作製したところ直線性が低かった ($R^2=0.941$)。

保管中における誘導体化アミノ酸の分解が示唆されたため、誘導体化アミノ酸の経時変化を測定した (表 3、図 3)。その結果、反応の 3 時間後には約 50% まで蛍光強度が減少することが明らかとなった。

表 3 OPA 誘導体化 GABA の経時変化

時間 (h)	蛍光強度 (面積)	強度比
0	1.45×10^8	1
1	1.21×10^8	0.83
2	9.32×10^7	0.64
3	7.65×10^7	0.53

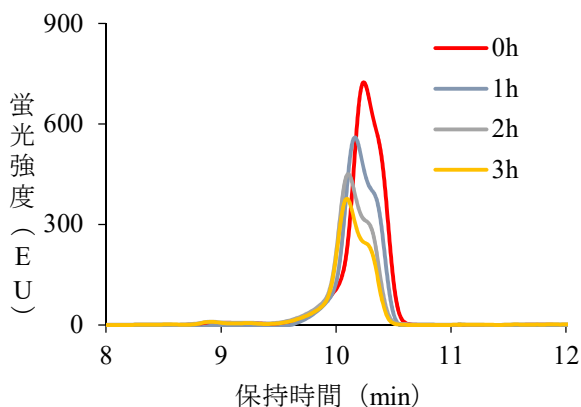


図3 OPA 誘導体化 GABA の経時変化
試料: 100 μM GABA

4.3 検量線の作製

4.2 において誘導体化反応後、顕著な蛍光強度の減少が明らかとなったため、それぞれ分析の直前に反応を行い、HPLC に供することとした。その結果図 4 のように 10-500 μM の間で直線性の高い検量線が得られた ($R^2=0.999$)

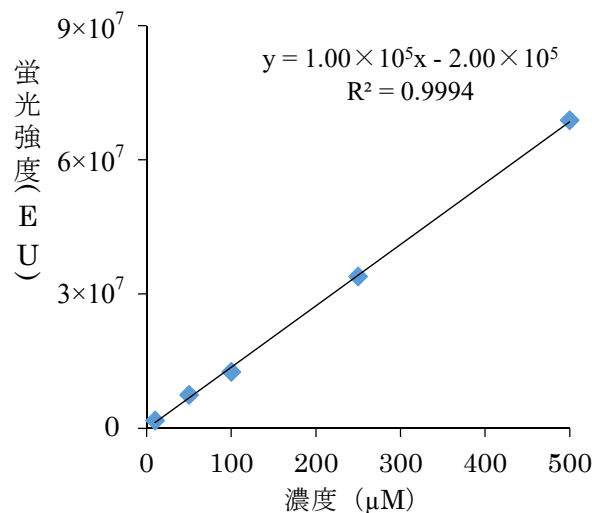


図4 OPA 誘導体化 GABA の検量線
試料: 10、50、100、250、500 μM GABA

5 まとめ

本研究では機能性アミノ酸である GABA の分析条件の検討を行った。誘導体化方法及び HPLC 条件の検討の結果、OPA を用いた場合にアミノ酸混合標準液と GABA の分離が可能となった。しかし OPA 誘導体化アミノ酸は不安定であり、時間経過で顕著な蛍光強度の減少が確認されたため、反応直後に分析する必要があることがわかった。今回 GABA の分析手法を確立できたため、今後は丹後産食品等を分析し、GABA 高含量食品の探索を行う予定である。

参考文献

- 丸山浩治; 発芽玄米中の γ -アミノ酪酸 (GABA) の分析, 食品機能性評価マニュアル集第 I 集 (改訂 2 版) (2009), http://www.fmric.or.jp/ffd/ffmanual/100426_tshida.pdf
- 八木潤; 汎用の高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いたアミノ酸分析, 関税中央分析所報, 第 57 号 (2017), pp67-74