

「記憶ケアドリンク βラクトリン 100ml」における
機能性関与成分 βラクトリンの定量・定性分析方法

1. 目的

試料中のβラクトリン（グリシン - トレオニン - トリプトファン - チロシン；以下、GTWY）は、液体クロマトグラフ-質量分析法（LC-MS/MS法）により、定性・定量分析を行う。具体的には、クロマトグラフ上の保持時間、質量分析上のMS/MS分析により定性を確認し、標準物質を用いた検量線により定量する。

2. 試薬、試料

- ・ 飲料試料(分析試料)
- ・ GTWY 標準品（株式会社ペプチド研究所）
- ・ アセトニトリル(HPLC グレード)
- ・ 蒸留水（ミリQ水）
- ・ ギ酸(LC/MS用)

3. 手法

(1) 飲料試料

- ① 飲料試料が凍結されている場合は、40℃の恒温水槽中に1時間静置、融解させる。
- ② ボルテックス、またはピペッティングで十分に攪拌し、沈殿を分散させる。
- ③ 試料1mlを測り取り、15mLチューブに分取する。
- ④ 10% ACN(蒸留水/アセトニトリル/ギ酸 = 80/20/0.1)で飲料試料を10倍希釈する。その後、ボルテックスにより均一に混合する。
- ⑤ 10倍希釈した飲料を100μL測り取り、15mLファルコンチューブに分取する。
- ⑥ 分取した10倍希釈飲料に3900μLの10% ACNを加え、40倍希釈する(原液の400倍希釈)。ボルテックスし、均一に混合する。
- ⑦ 14,000g、3分、25℃(室温)で遠心分離する。
- ⑧ 0.2μmろ過フィルターを装着した5mLシリンジに上清を充填し、ろ過する。
- ⑨ ろ液を1.5mLガラスバイアルに移し、分析用飲料試料とする。

(2) Gly-Thr-Trp-Tyr 標準試料

GTWY標準品10mgを秤量し、DMSOで溶解して10mLに定容する（1000μg/mL溶液）。この時の秤量値（10mg）は、以下の式で補正し、正確に1000μg/mL溶液になるよう調製する。

$$\text{GTWY秤量値(mg)} = 10 \times (M + 18.0 \times n) / M \times (100/P)$$

M : GTWY分子量 (525.6)

n : GTWY標準品のデータシートに記載されている水(分子量18.0)の係数

P : GTWY標準品のデータシートに記載されているHPLC純度(%)

1000 $\mu\text{g/mL}$ 溶液をミリQ水で100倍希釈して10 $\mu\text{g/mL}$ 溶液を調製し、小分けして-20°Cで冷凍保存する。これを標準溶液ストックとし、随時解凍して使用する。

標準溶液ストック (10 $\mu\text{g/mL}$) を解凍後、5分間超音波処理し、0.1%ギ酸含有10%アセトニトリルで順次希釈して、0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液を調製する。

4. 分析

(1)分析方法

各測定用標準溶液及び試験溶液を以下に示す条件の液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計に注入し、GTWYの濃度を求めた。

<液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計操作条件>

機種 (LC部) : LC-2030 [株式会社 島津製作所]

機種 (MS部) : LCMS-8050[株式会社 島津製作所]

カラム : TSKgel ODS-100V ϕ 2.0 mm \times 150 mm, 3 μm [東ソー株式会社]

ガードカラム : TSKgel guardgel ODS-100V, 3 μm [東ソー株式会社]

カラム温度 : 40 °C

移動相 : A ; 0.1 %ギ酸

B ; 0.1 %ギ酸含有アセトニトリル

時間(分)	0	5	15	20	20.01	30
移動相A(%)	90	80	0	0	90	90
移動相B(%)	10	20	100	100	10	10

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 2 μL

イオン化法 : ESI(正イオン検出モード)

ネブライザーガス : 3 L/min

ヒーティングガス : 10 L/min

ドラインガス : 10 L/min

インターフェイス温度 : 300 °C

DL温度	: 250 °C
ヒートブロック温度	: 400 °C
コリジョンガス	: アルゴン
コリジョンエネルギー (CE)	: - 32 V (定量) 、 -24 V (確認)
インターフェイス電圧	: 4 kV
設定質量数 (m/z)	: 526.2→158.9 (定量) 、 526.2→350.9 (確認)

(2)定性分析

標準溶液と試験溶液について、GTWY の質量イオンの検出およびピークの保持時間の一致をもって定性確認とする。

(3)定量分析

標準溶液と試験溶液について、GTWY の質量イオンのピーク面積を測定する。各濃度の標準溶液のピーク面積の測定値から検量線を作成し、試験溶液中の GTWY 濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を定量する。試験溶液中の GTWY 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)、希釈倍率(400)を下記の換算式に代入し、発酵乳 1 個中の GTWY 量 ($\text{mg}/100\text{ml}$) に換算する。

飲料試料 1 本中の GTWY 量 ($\text{mg}/100\text{ml}$) =

$$\frac{\text{試験溶液中 GTWY 濃度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{希釈倍率}(400) \times \text{飲料試料 1 本の体積}(100\text{ml})}{1,000}$$

以上