Trace Nutrients Research 25 : 147−151 (2008)

原　著

誘導体化とガスクロマトグラフィー −質量分析によるセレン強化食品中の含セレンアミノ酸の同定−

塩 川 真 人，水 谷 泰 輔，吉 田 宗 弘
（関西大学化学生命工学部生命・生物工学科食品工学研究室*）

Identification of Selenoamino Acids in Selenium-enriched Foods by Derivatization and Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Makoto Shiokawa, Taisuke Mizutani and Munehiro Yoshida
Laboratory of Food and Nutritional Sciences, Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, Yamate 3-3-35, Suita, Osaka, 564-8680, Japan

Summary

Selenoamino acids in selenium (Se)-enriched foods were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) after derivatization using a commercial amino acid analysis kit (EZ : faast^{TM}). After the derivatization, a compound eluted at the same retention time as derivatized *Se*-methylselenocysteine (MeSec) in GC was detected in Se-enriched *Kaiware* radish sprouts and Se-enriched garlic bulb. Mass spectrum of this derivatized compound was coincident with that of derivatized MeSec ; MeSec was identified in these Se-enriched foods. Similarly, selenomethionine was identified in Se-enriched yeast using EZ : faast^{TM} and GC-MS. Analysis by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry showed a presence of selenohomolanthionine (SeHL) in Se-enriched mung bean sprouts. However, SeHL could not be analyzed by GC-MS after the derivatization by EZ : faast^{TM}.

疫学調査や動物実験によって，必須微量元素のセレンには抗腫瘍作用のあることが明らかにされている[1]。しかし，セレン化合物は毒性も強いため，ヒトへの応用は進んでいない。セレンはイオウの同族元素であり，自然界には含硫アミノ酸のセレンアナログである含セレンアミノ酸が存在している。とくに，セレンを蓄積した植物には，*Se*-メチルセレノシステイン（MeSec）をはじめとする多様な含セレンアミノ酸が存在する[2,3]。われわれは，MeSec を豊富に含有するセレン強化カイワレダイコンスプラウトが亜セレン酸に比較してセレンとしての栄養有効性は低いが，抗腫瘍活性は高いことを示した[4,5]。このようにセレン強化植物には，機能性の高い含セレンアミノ酸が存在しており，高セレン環境下で野菜類を栽培する試みが世界各地で行われている[6]。

セレン化合物の同定には，誘導結合プラズマ質量分析（ICPMS）を検出に用いた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）が頻用されている。前者ではセレン化合物を特異的に検出でき，後者では未知化合物の構造を推定できる。しかし，HPLC-ICPMS が有機溶媒，LC-MS が不揮発性の溶媒をそれぞれ嫌うことから，両者を共通のカラム－溶媒系で実施することは困難である。したがって，セレン化合物の同定において HPLC-ICPMS と LC-MS は独立して用いられており，食品や生体中のセレン化合物の同定を効率よく進めることは現在でも難しい。

一方，ガスクロマトグラフィー－質量分析（GC-MS）は，未知化合物の同定技術として古くから確立している。含セレンアミノ酸のような非揮発性化合物の場合，GC-MS で分析するには誘導体化処理を行うことが必要である。近年，生体や食品中の遊離アミノ酸を固相抽出後，誘導体化処理するキット（アミノ酸誘導体化キット）が開発されており，アミノ酸類の GC-MS 分析を簡便かつ短時間で実施することが可能となっている。今回，セレン強化食品中の含セレンアミノ酸をこのようなアミノ酸誘導体化キットと GC-MS を用いて同定することに成功したので報告する。

実験方法

1．試料など

セレン強化カイワレダイコンスプラウトとセレン強化リョクトウスプラウトは，既報[2]に記載した方法に従って栽培したものを用いた。セレン強化ニンニク鱗茎は植物セレニウム研究所（熊本，阿蘇町）から購入した。セレン強化酵母乾燥粉末は Biospringer 社（フランス）が生産した

*所在地：吹田市山手町 3–3–35（〒564–8680）

ものを光洋商会（東京）から購入した。セレン強化酵母以外の試料は，凍結乾燥後，ミルで粉末とした。各試料のセレン含量（μg/g dry weight）は以下のとおりである。セレン強化カイワレダイコン，82.3；セレン強化リョクトウスプラウト，16.7；セレン強化ニンニク，226；セレン強化酵母，1154。

実験に使用した試薬中，セレノホモランチオニン（SeHL）は千葉大学薬学部衛生化学教室から供与されたものを使用した。その他の試薬は市販のものを用いた。また，アミノ酸誘導体化を行うためのアミノ酸分析キット EZ: faast™（Phenomenex 社，米国）は島津 GLC（京都）より購入した。

2. 含セレンアミノ酸の抽出

セレン強化酵母以外の試料については，乾燥粉末 100 mg に 50% エタノール 5 mL を加え，十分に撹拌した後，遠心分離して抽出液を調製し，分析用の試料とした。抽出液へのセレンの抽出率（%）は以下のとおりであった。セレン強化ニンニク，85.2；セレン強化カイワレダイコンスプラウト，80.9；セレン強化リョクトウスプラウト，61.0。

セレン強化酵母は既報[7]に従って，乾燥酵母100 mgを5 mLの蒸留水中で10 mgのプロテアーゼXIV®（Sigma-Aldrich 社，米国）を用いて室温（約 25℃）で 24 時間加水分解処理を行い，遠心分離して得られた抽出液を分析用の試料とした。抽出液へのセレンの抽出率は 85.4% だった。

3. キットによる含セレンアミノ酸の誘導体化と GC-MS による分析

各抽出液 100 μL にアミノ酸分析キットである EZ : faast™ を用いて誘導体化処理を行い，GC-MS用の試料を調製した。GC-MS の分析条件は以下のとおりである。機器，Parvum 2（島津，京都）；カラム，Zebron ZB-AAA（Phenomenex 社，米国）；キャリアガス，ヘリウム；流量，1.1 mL/min；気化温度，250℃；カラム温度，110～320℃（30℃/min 昇温）；分析時間，7 分；試料注入量，2 μL；イオン源温度，240℃；スキャン範囲，45～450 *m/z*；サンプリング速度，3.5 scan/s。

4. HPLC−ICPMS による分析

リョクトウスプラウト抽出液を HPLC-ICPMS で分析し，含有されるセレン化合物の分子種を推定した。分析条件は以下のとおりである。カラム，Develosil RP-Aqueous（野村化学）；移動相，0.1% トリフルオロ酢酸；試料注入量，20 μL；流速，0.5 mL/min；検出器，島津 ICPM-8500；検出質量数，77, 78, 82。

結果と考察

1. セレン強化カイワレダイコンとセレン強化ニンニク

すでに，HPLC-ICPMS を用いた分析においては，セレン強化カイワレダイコンとセレン強化ニンニク中のセレンの主要な分子種が MeSec であることが示されている[2,3]。そこで本実験では，セレン強化カイワレダイコンとセレン強化ニンニク中に存在すると考えられる MeSec を誘導体化後，GC-MS を用いて同定することを試みた。

Fig. 1 は，EZ : faast™ を用いて誘導体化した MeSec，誘導体化処理したセレン強化カイワレダイコンスプラウト抽出液，および誘導体化処理したセレン強化ニンニク抽出液

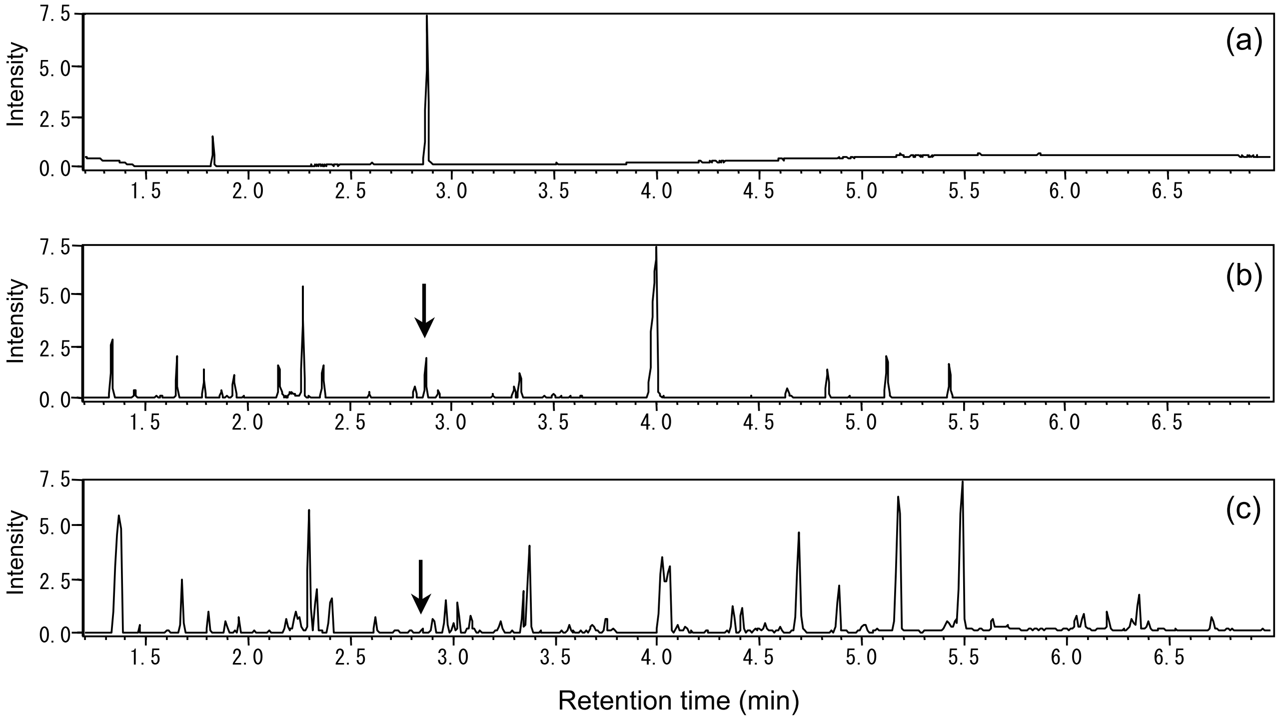

Fig. 1 Gas chromatpgrams of derivatized *Se*-methylselenocysteine (a), extact from selenium-enriched *Kaiware* radish sprouts (b) and extract from selenium-enriched garlic bulb (c).

のガスクロマトグラムを示したものである。Fig. 1(a)に示すように，標準 MeSec の誘導体に由来するピークは保持時間 2.87 分付近に認められた。これに対して，誘導体化処理したセレン強化カイワレダイコンスプラウト抽出液とセレン強化ニンニク抽出液のクロマトグラムにも，Fig.1 (b) および（c）のように，標準 MeSec の誘導体と同じ保持時間を示す化合物の存在が認められた。

Fig. 2 は，Fig. 1(b)において保持時間 2.87 分を示した化合物のマススペクトルを標準 MeSec の誘導体のマススペクトルと比較したものである。両者のマススペクトルはほぼ一致していた。また，Fig. 1(c)において保持時間 2.87 分を示した化合物もほぼ同様のマススペクトルを示した（データ略）。

天然には^{80}Se をはじめとする様々なセレンの安定同位体が存在する。この中で^{78}Se，^{80}Se，^{82}Se の 3 つに着目すると，それらの天然における存在比（^{78}Se：^{80}Se：^{82}Se）は 2：4：1 に近似している。このことは，マススペクトルにおいて m−2，m，m+2 m/z の比が 2：4：1 を示す分子イオンピークやフラグメントイオンピークが存在すれば，その化合物がセレンを含有する可能性が高いことを意味する。本実験で用いたアミノ酸分析キットを用いると，Fig. 2 に記した構造式のように，アミノ酸のアミノ基がカルボキシプロピル化，カルボキシル基がプロピル化されるので，誘導体の分子量はもとのアミノ酸よりも 128 増加する。Fig. 2(a) および（b）には，誘導体化 MeSec（$C_{11}H_{21}O_4NSe$）の分子イオンに由来する 309，311，313 m/z, および誘導体からカルボキシプロピル基（C_3H_7COO-）が 1 つとれたフラグメントイオンに由来する 222，224，226 m/z がいずれも約 2：4：1 の比で認められる。また，他にも m−2，m，m+2 m/z の比が 2：4：1 となっているイオンピークがいくつか存在しており，これらは誘導体化MeSecのマススペクトルの大きな特徴といえる。以上のことから，Fig.1 (b) および（c）で認められた保持時間 2.87 分を示す化合物は誘導体化 MeSec であり，セレン強化カイワレダイコンスプラウトとセレン強化ニンニク中に MeSec の存在することを GC-MS を用いて証明できたと考える。

2. セレン強化酵母

多くの研究によって，セレン強化酵母中のセレンの分子種のほとんどはセレノメチオニン（SeM）であることが明らかにされている[7]。そこで本実験では，セレン酵母中に存在すると考えられる SeM を誘導体化後，GC-MS を用いて同定することを試みた。

Fig. 3 は，EZ：faast^{TM} を用いて誘導体化した SeM，および誘導体化処理したセレン強化酵母抽出液のガスクロマトグラムを示したものである。Fig. 3 (a) に示すように，標準 SeM の誘導体に由来するピークは保持時間 3.23 分付近に認められた。これに対して，セレン強化酵母抽出液のクロマトグラムにも，Fig. 3 (b) のように，標準 MeSec の誘導体と同じ保持時間を示す化合物が認められた。

Fig. 4 は，Fig. 3 (b) で認められた保持時間 3.23 分を示す化合物のマススペクトルを標準 SeM の誘導体と比較し

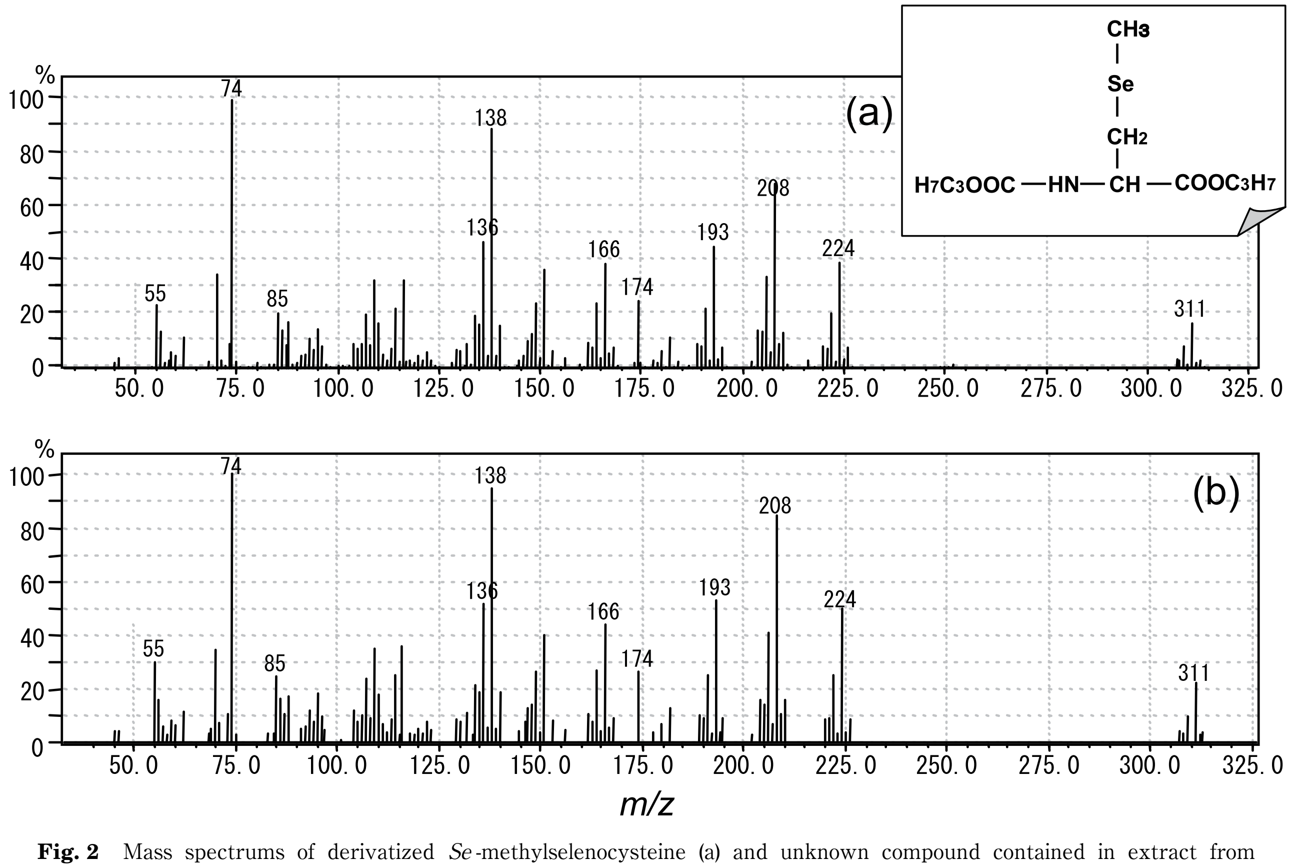

Fig. 2 Mass spectrums of derivatized *Se*-methylselenocysteine (a) and unknown compound contained in extract from selenium-enriched *Kaiware* radish sprouts (b).

たものである。両者のマススペクトルはほぼ一致していた。とくに，誘導体化 MeSec（$C_{12}H_{23}O_4NSe$）の分子イオンに由来する 323, 325, 327 *m/z*，フラグメント CH_3SeCH_2 に由来する 107, 109, 111 *m/z*，フラグメント $CH_3SeCH_2CH_2$ に由来する 121, 123, 125 *m/z* などのセレン化合物の特徴を示すイオンピークが共通して認められた。したがって，Fig. 3（b）で認められた保持時間 3.23 分の化合物は誘導体化 SeM であり，セレン強化酵母中に MeSec の存在することも GC-MS を用いて証明できたといえる。

3. セレン強化リョクトウスプラウト

セレン強化リョクトウスプラウト中のセレンの分子種については報告例が存在しない。そこでまず，HPLC-ICPMS を用いて，セレン強化リョクトウスプラウト中のセレンの分子種を推定した。セレン強化リョクトウスプラウト抽出液を HPLC-ICPMS で分析したところ，ほとんどのセレンは SeHL と同じ保持時間（5.1 分）に溶出され，セレン強化リョクトウスプラウトに SeHL の存在することが推察された（データ略）。次に，他の試料と同様に，標準 SeHL を誘導体化処理し，GC-MS で分析した。しかし，標準 SeHL の誘導体を検出することはできなかった。今回用いたアミノ酸分析用キット（EZ : faast™）は一般的なアミノ酸の中でアルギニンの分析ができない。これは本キットで誘導体化したアルギニンの沸点が高いためである。おそ

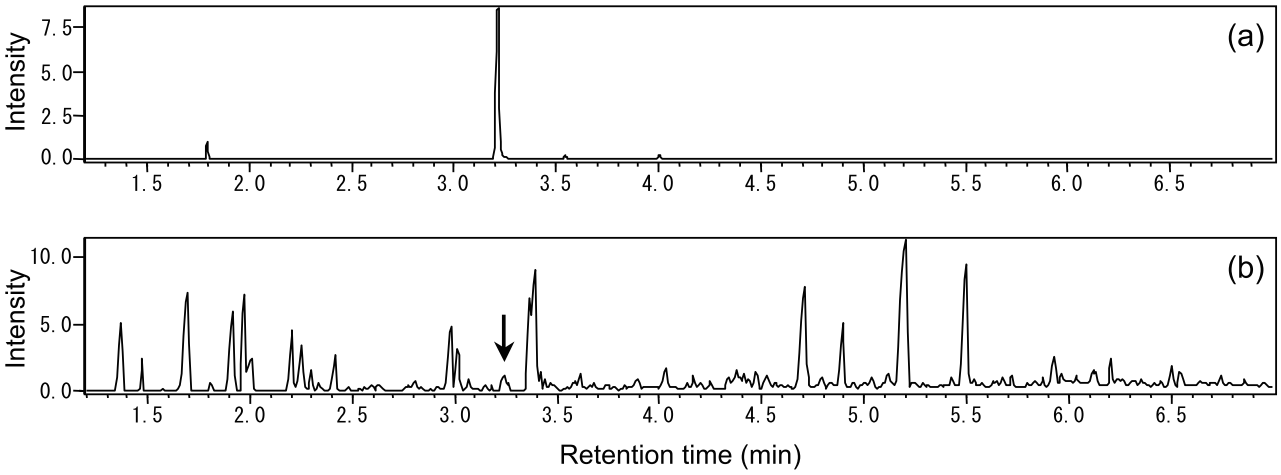

Fig. 3　Gas chromatograms of derivatized selenomethionine (a) and extract from selenium-enriched yeast (b).

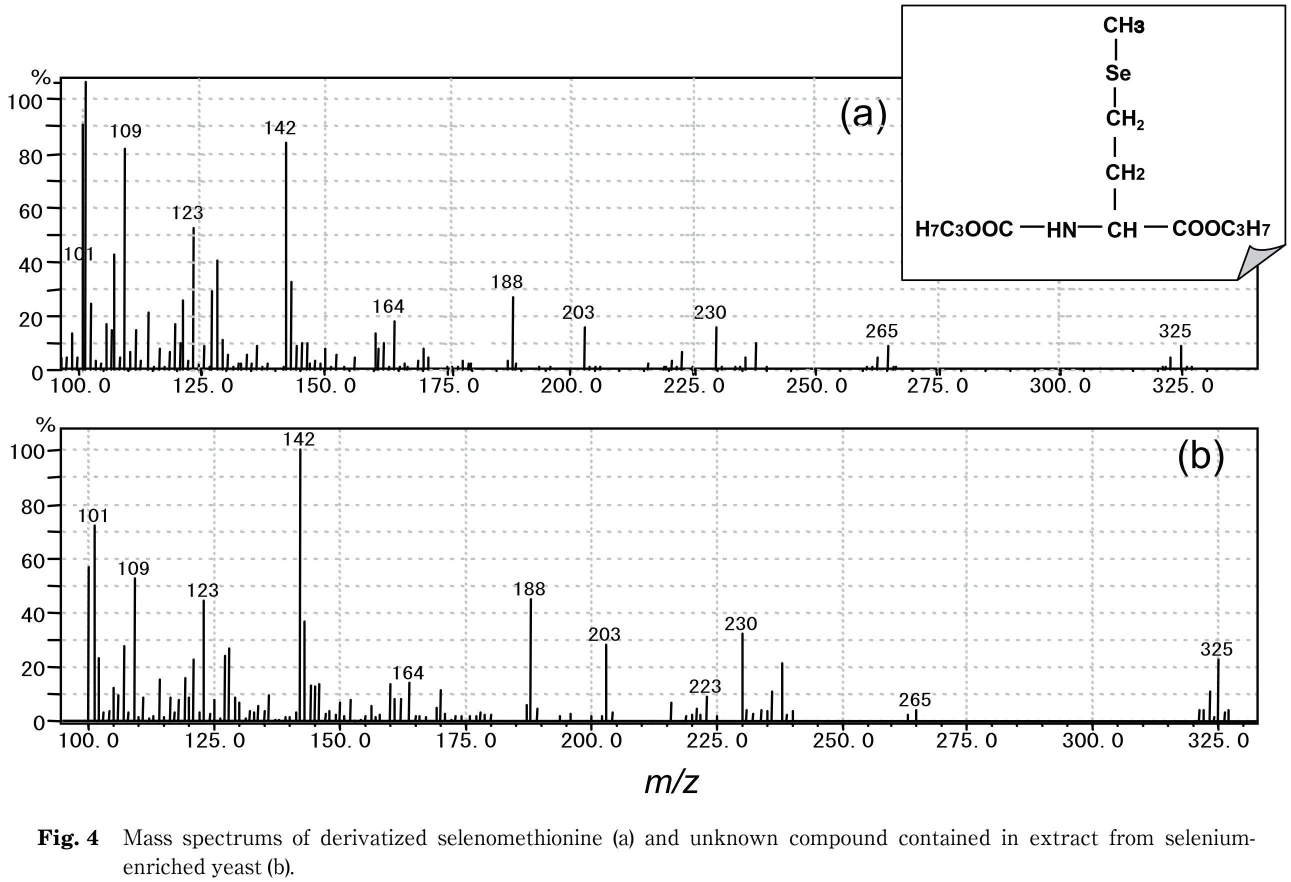

Fig. 4　Mass spectrums of derivatized selenomethionine (a) and unknown compound contained in extract from selenium-enriched yeast (b).

らくSeHLの誘導体もアルギニンの誘導体と同様に高沸点であるため，分析ができなかったと考えられる。

今回，GC-MS分析に用いたアミノ酸分析用キット（EZ：faast™）は，種々のアミノ酸を，誘導体化を含めて30分以内で定量分析できるようにしたものである。ただし，分析感度はあまり高くなく，含セレンアミノ酸を同定・定量するには，試料中セレン濃度が数ppm以上必要であった。したがって，一般の食品の含セレンアミノ酸の分析に用いる場合には，含セレンアミノ酸画分の濃縮操作が必要であり，さらに検討が必要と判断された。

謝　辞

SeHLを御供与いただいた千葉大学薬学研究院の小椋康光博士に御礼を申し上げます。なお本研究は平成20年度厚生科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業・日本人の食事摂取基準を推定するためのエビデンスの構築に関する研究（主任研究者：柴田克己）を受けて行ったものである。

参考文献

1）Surai PF (2006) Selenium and cancer. in Selenium in Nutrition and Health, Nottingham University Press, Nottingham : pp. 671−720.

2）Sugihara S, Kondo M, Chihara Y, Yuji M, Hattori H, Yoshida M (2004) Preparation of selenium-enriched sprouts and identification of their selenium species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. Biosci Biotech Biochem 68 : 193−199.

3）Yoshida M, Sugihara S, Inoue Y, Chihara Y, Kondô M, Miyamoto S, Sukcharoen B (2005) Composition of chemical species of selenium contained in selenium-enriched shiitake mushroom and vegetables determined by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. J Nutr Sci Vitaminol 51 : 194−199.

4）Finley JW (2005) Selenium accumulation in plant foods. Nutr Rev 63 : 196−202.

5）Yoshida M, Okada T, Namikawa Y, Matsuzaki Y, Nishiyama T, Fukunaga K (2007) Evaluation of nutritional availability and anti-tumor activity of selenium contained in selenium-enriched *Kaiware* radish sprouts. Biosci Biotech Biochem 71 : 2198−2305.

6）Yoshida M, Sano K, Ishiyuki E, Nishiyama T, Fukunaga K (2007) Assessment of nutritional availability of selenium in selenium-enriched pumpkin. Biomed Res Trace Elem 18 : 391−394.

7）Yoshida M, Sugihara S, Suenaga S, Naito C, Fukunaga K, Tsuchita H (2002) Digestibility and chemical species of selenium contained in high-selenium yeast. J Nutr Sci Vitaminol 48 : 401−404.