

## セレン蓄積植物に存在する含セレンアミノ酸のLC-MSによる同定

水谷 泰輔, 吉田 宗弘  
(関西大学化学生命工学部食品工学研究室\*)

## Identification of Several Selenoamino Acids Contained in Selenium-accumulated Plants by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

Taisuke MIZUTANI, Munehiro YOSHIDA

Laboratory of Food and Nutritional Sciences, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University,  
Yamate 3-3-35, Suita, Osaka 564-8680, Japan

### Summary

Selenoamino acids in selenium (Se)-accumulated plants were identified by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). A compound eluted at the same retention time as *Se*-methylselenocysteine (MeSec) in LC was detected in 0.1 M HCl extract prepared from Se-enriched *Kaiware* radish sprouts. Mass spectrum of this compound was coincident with that of MeSec; MeSec was identified in the Se-enriched *Kaiware* radish sprouts by LC-MS. Similarly,  $\gamma$ -glutamylmethylselenocysteine and selenohomolanthionine, which had not been identified by GC-MS, were identified by LC-MS in Se-enriched garlic and Se-enriched mung bean sprouts, respectively.

セレンを高濃度に蓄積させた植物に抗腫瘍効果を有するセレン化合物の存在することが示されており<sup>1)</sup>, セレン蓄積植物に含まれるセレンの分子種を明らかにする試みが盛んである<sup>2)</sup>。われわれはすでに、高速液体クロマトグラフィーと誘導結合プラズマ質量分析を組み合わせた分析系(HPLC-ICPMS)を用いて種々のセレン蓄積植物を分析し、これらに含セレンアミノ酸であるSe-メチルセレンシステイン(MeSec)<sup>3,4)</sup>,  $\gamma$ -グルタミル-Se-メチルセレンシステイン( $\gamma$ -GluMeSec)<sup>3,4)</sup>, セレノメチオニン(SeM)<sup>3,4)</sup>, セレノホモランチオニン(SeHL)<sup>5)</sup>の存在を示し、さらにアミノ酸誘導体化キットの使用により、ガスクロマトグラフィー-質量分析(GC-MS)を用いてセレン蓄積野菜中のMeSecと高セレン酵母中のSeMの同定に成功した<sup>5)</sup>。しかし、 $\gamma$ -GluMeSecとSeHLに関しては、誘導体化しても沸点が高いため、GC-MSではうまく同定できなかった。今回、液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)を用いることによって、セレン蓄積植物中のMeSec、 $\gamma$ -GluMeSecおよびSeHLの同定に成功したので報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料および試薬

セレン強化カイワレダイコンsprautとリョクトウスプラウトは既報<sup>3)</sup>に記載した方法で調製した。セレン強化

ニンニクは植物セレンウム研究所(熊本, 阿蘇町)から購入したものを用いた。いずれも凍結乾燥後, ミルで細粉化した。それぞれの凍結乾燥後のセレン含量( $\mu\text{g/g}$ )は以下のとおりである。強化カイワレダイコンspraut, 125; セレン強化リョクトウスプラウト, 45.6; セレン強化ニンニク, 85.2。

MeSecはSigma-Aldrich(St. Louis)より購入, SeHLは昭和薬科大学小椋康光教授から供与されたものを使用し,  $\gamma$ -GluMeSecは株式会社ベックス(東京)に合成を依頼した。その他はいずれも市販の特級試薬を用いた。

#### 2. 含セレンアミノ酸の抽出

凍結乾燥粉末試料約0.1 gに0.1 M塩酸5 mL加え, 十分に攪拌して低分子セレン化合物を抽出した。抽出液を遠心後, メンブランフィルター(0.45  $\mu\text{m}$ )で濾過し, 分析用の試料とした。

#### 3. LC-MSによる分析

各抽出液を以下の要領でLC-MS(Applied Biosystems, API 3000, 東京)を用いて分析した。すなわち, セレン強化カイワレダイコンsprautとセレン強化ニンニク抽出液の分析条件は, カラムがCadenza CD-C18(Imtakt, 京都), 移動相が水/アセトニトリル(70/30(0分)~10/90(40分)), 流速が0.2 mL/min, セレン強化リョクトウスプラウ

\*所在地: 吹田市山手町 3-3-35 (〒564-8680)

ト抽出液の分析条件は、カラムが Inertsil ODS-3 (GL Sciences, Torrance), 移動相が水/アセトニトリル (80/30 (0分)~10/90 (45分)), 流速が0.2 mL/min である。

## 結果と考察

### 1. セレン強化カイワレダイコンスプラウト

Cadenza CD-C18 カラムを用いた分析系において、標準 MeSec は保持時間 8.5 分付近に溶出された。同じ系を用いてセレン強化カイワレダイコンスプラウトから調製した抽出液を分析したところ、Fig. 1a に示すように、保持時間 8.5 分に大きなピークを検出した。Fig. 1b は、このピークのマススペクトルである。セレンにはいくつかの同位体が存在し、この中で  $^{78}\text{Se}$ ,  $^{80}\text{Se}$ ,  $^{82}\text{Se}$  の存在比は約 2 : 4 : 1 である。したがって理論的には、MeSec のマススペクトルにおいて、分子イオンピークに相当する  $m/z$  181, 183, 185 が 2 : 4 : 1 の大きさに検出されることになる。Fig. 1b では、 $m/z$  181, 183, 185 に近似する  $m/z$  181.8, 183.6, 185.9 のピークがほぼ 2 : 4 : 1 の大きさに認められる。また、標準の MeSec のマススペクトル (データ略) も Fig. 1b にほぼ一致していた。以上のことから、セレン強化カイワレダイコンスプラウトから調製した抽出液を分析したとき、保持時間 8.5 分に溶出された物質は MeSec であると結論できる。

### 2. セレン強化ニンニク

MeSec の分析と同じ Cadenza CD-C18 カラムを用いた分析系において、標準  $\gamma$ -GluMeSec は保持時間 9.7 分付近に溶出された。同じ系を用いてセレン強化ニンニクから

調製した抽出液を分析したところ、Fig. 2a に示すように、保持時間 9.7 分に大きなピークを検出した。Fig. 2b は、このピークのマススペクトルである。セレンの同位体比から考えると、 $\gamma$ -GluMeSec のマススペクトルには、分子イオンピークに相当する  $m/z$  310, 312, 314 が約 2 : 4 : 1 の大きさに検出されるはずである。Fig. 2b では、 $m/z$  310, 312, 314 に近似する  $m/z$  310.7, 313.0, 315.1 がほぼ 2 : 4 : 1 の大きさに認められる。また、標準の  $\gamma$ -GluMeSec のマススペクトル (データ略) も Fig. 2b にほぼ一致していた。以上のことから、セレン強化ニンニクから調製した抽出液を分析したとき、保持時間 9.7 分に溶出された物質は  $\gamma$ -GluMeSec であると結論できる。

### 3. セレン強化リョクトウスプラウト

Inertsil ODS-3 カラムを用いた分析系において、標準 SeHL は、Fig. 3a に示すように、保持時間 42.37 分に溶出された。Fig. 3b に標準 SeHL のマススペクトルを示した。SeHL はマススペクトルにおいて、同位体比が最大である  $^{80}\text{Se}$  に由来する分子イオンピーク  $m/z$  286 を示すはずであるが、実際のマススペクトルにおいては、 $m/z$  284.4 に最大のピークを示した。 $m/z$  のずれの原因は不明であるが、これが SeHL の分子イオンピークであると判断した。また、 $^{78}\text{Se}$  と  $^{82}\text{Se}$  に由来すると考えられる  $m/z$  282.4 と 286.8 のピークも検出されたが、 $m/z$  284.4 に比較して  $m/z$  282.4 と 286.8 の存在比は相当小さかった。

同じ系を用いてセレン強化リョクトウスプラウトから調製した抽出液を分析したところ、Fig. 4a に示すように、標準 SeHL に一致する保持時間 42.43 分のピークを検出した。Fig. 4b はこのピークのマススペクトルである。標

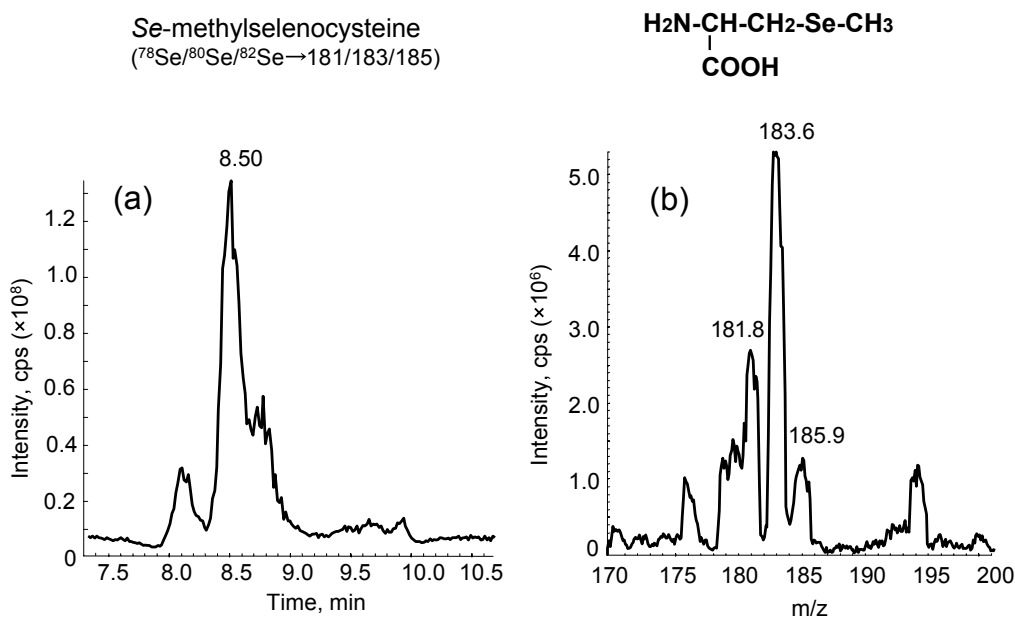
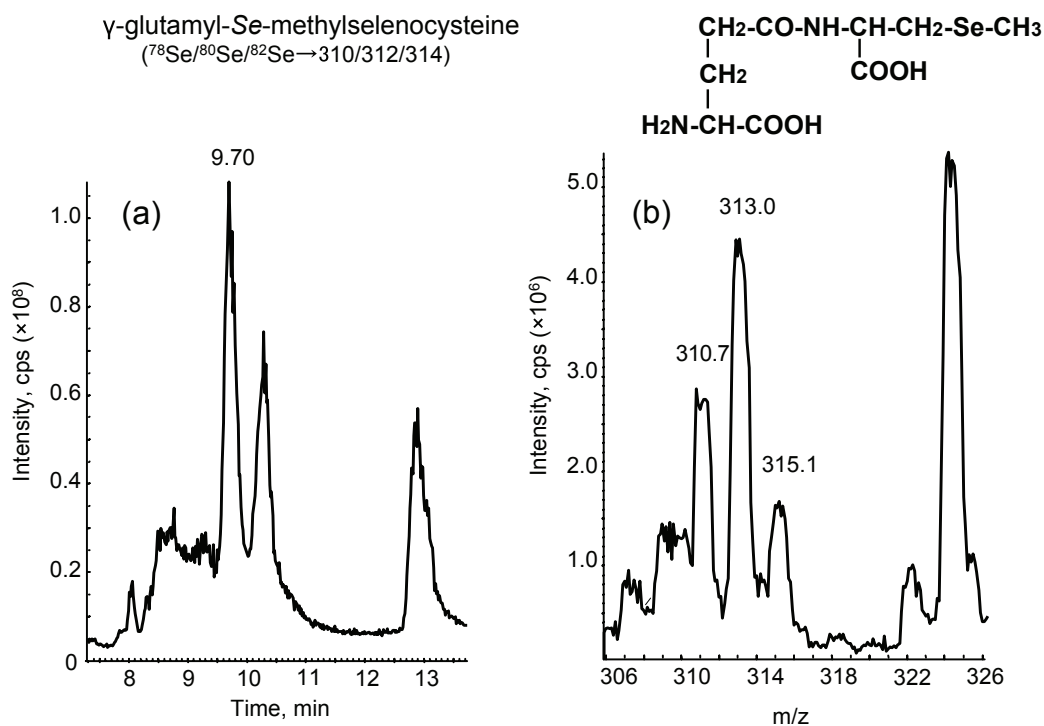
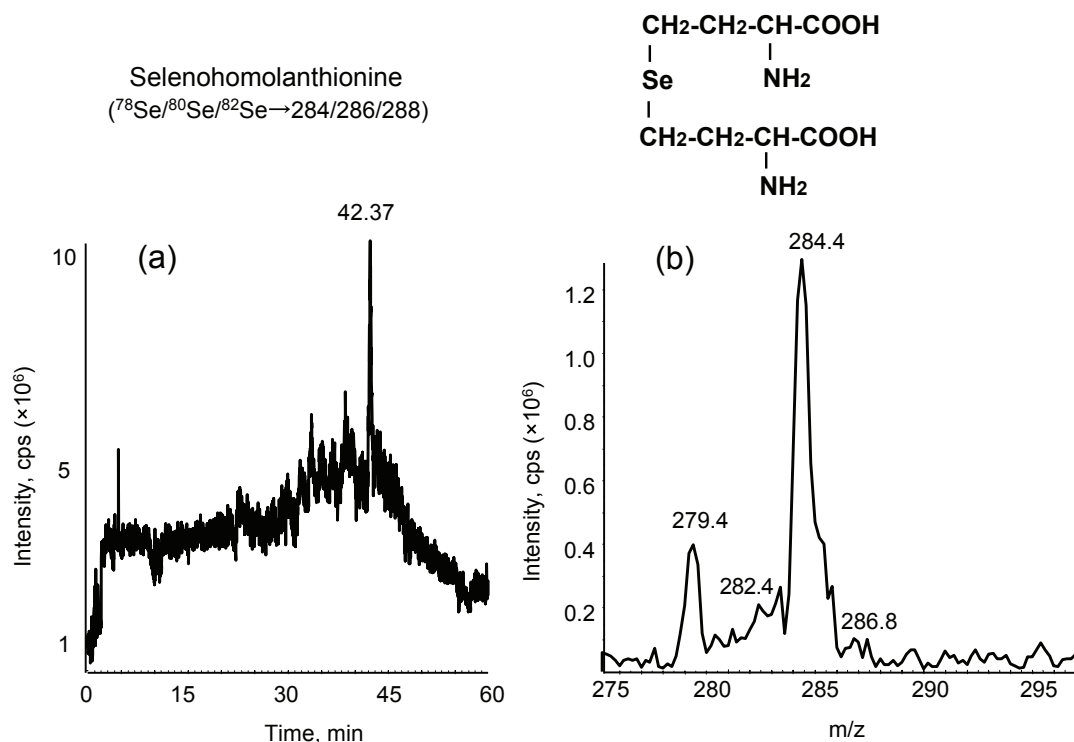


Fig. 1 Analysis of 0.1 M HCl extract prepared from selenium-enriched Kaiware radish sprouts by LC-MS; (a) liquid-chromatogram and (b) mass spectrum.



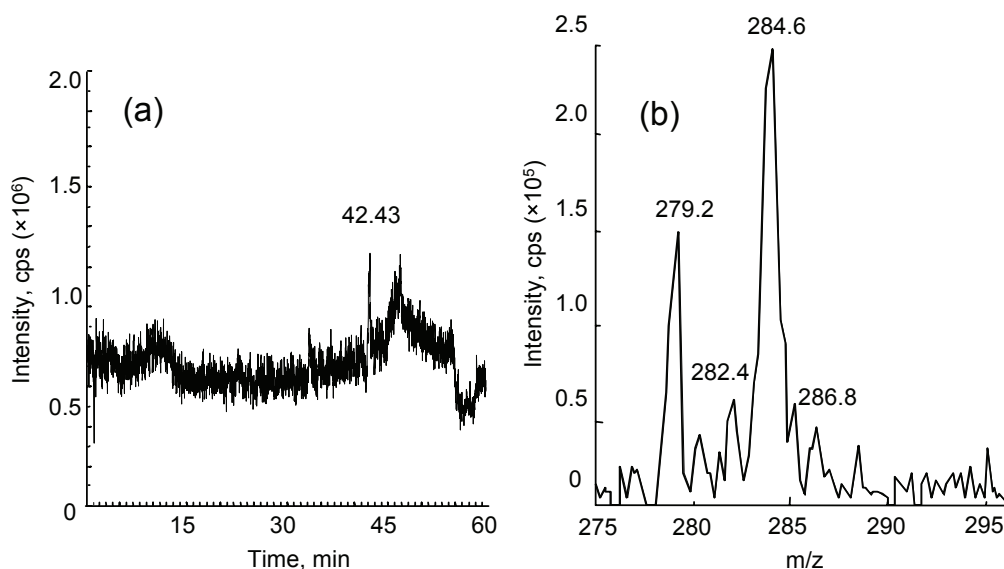
**Fig. 2** Analysis of 0.1 M HCl extract prepared from selenium-enriched garlic by LC-MS; (a) liquid-chromatogram and (b) mass spectrum.



**Fig. 3** Analysis of standard selenohomolanthionine by LC-MS; (a) liquid-chromatogram and (b) mass spectrum.

準 SeHL のマススペクトルで認められた  $m/z$  284.4 の分子イオンピークに相当すると考えられる  $m/z$  284.6 の大きなピークを認めた。また、標準 SeHL で認められた  $m/z$  279.4 のフラグメントイオンピークに相当すると考えられる  $m/z$  279.6 のピークも検出できた。以上、 $^{78}\text{Se}$  と  $^{82}\text{Se}$  に

由来する分子イオンピークやフラグメントイオンピークが理論量検出できないという不満は残るが、セレン強化リョクトウスプラウト抽出液において保持時間 42.43 分のピークは、マススペクトルが標準 SeHL にはほぼ一致していることから、SeHL であると結論できるだろう。



**Fig. 4** Analysis of 0.1 M HCl extract prepared from selenium-enriched mung bean sprouts by LC-MS; (a) liquid-chromatogram and (b) mass spectrum.

#### 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) 吉田宗弘 (2008) 植物に存在する含セレンアミノ酸の同定と生理機能. 化学と生物 46 : 564-570.
- 3) Sugihara S, Kondô M, Chihara Y, Yûji 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.
- 4) 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.
- 5) 塩川真人, 水谷泰輔, 吉田宗弘 (2008) 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. 微量栄養素研究 25 : 147-151.