

## 報 文

高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による  
液状食品中のプロリンの光学異性体分離分析小濱 純<sup>1</sup>, 斉藤 貢一<sup>1</sup>, 坂本 裕則<sup>1</sup>, 岩崎 雄介<sup>1</sup>,  
伊藤 里恵<sup>1</sup>, 堀江 正一<sup>2</sup>, 中澤 裕之<sup>®1</sup>

食品添加物として使用されている L-プロリンをキラル分離・定量するために、オルトフタルアルデヒド (OPA) と 9-フルオレニルメチルクロロホルメート (FMOC-Cl) を使用した選択的な前処理法を検討し、液体クロマトグラフィー/質量分析法によるプロリンの高感度かつ選択的な測定法の構築を試みた。夾雑成分の 1 級アミノ酸を OPA 試薬により誘導体化し、固相抽出カートリッジを用いて 2 級アミノ酸であるプロリン及びヒドロキシプロリンとの分離を行い、続いて 2 級アミノ酸を FMOC 誘導体とした。この 2 ステップ誘導体化法により試料のクリーンアップが効果的に行われ、2 級アミノ酸に選択的な前処理が可能となった。また、β-シクロデキストリン系のキラルカラムを極性有機相モードで用いることにより、プロリンの良好な光学異性体分離が達成された。清涼飲料水、粉ミルク及び食酢を試料として添加回収試験を行った結果、平均回収率は 80~104% 以内と良好であった。本法は液状食品中のプロリンを光学分離、測定することが可能であり、食品添加物として使用されるプロリンの安全性を確保するための有効な分析法の一つになるものと期待される。

## 1 緒 言

アミノ酸は食品添加物として調味及び栄養強化の目的で、多くの食品に使用されている。その中でも、光学活性を有しているプロリンは、L 体のみが既存添加物として指定<sup>1)</sup>されており、近年では、L-プロリンは脂肪燃焼作用や美肌作用を目的として清涼飲料水や健康食品などに多用されている。しかし、エナンチオマーの D-プロリンは神経毒性を有すると報告されている<sup>2)</sup>。また、食品添加物として輸入される L-アスコルビン酸、L-グルタミン酸ナトリウム、アスパルテーム等が、成分規格 (比旋光度) 不適合として問題となっている事例<sup>3)</sup>もある。そのため、食品衛生の観点から D 体と L 体を分離測定して光学純度を評価する必要がある。

プロリンの光学純度測定法として、食品添加物公定書解説書第 7 版では、比旋光度による純度試験<sup>1)</sup>や電位差滴定法による定量法<sup>1)</sup>が規定されているが、複雑なマトリックスから成る食品分析への応用は困難である。一方、食品におけるアミノ酸の分析法として、夾雑成分との分離が可能で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた方法が

汎用されている。また、衛生試験法等では自動アミノ酸分析装置を用いた分析法<sup>4)</sup>が使用されている。しかし、この方法は、アミノ酸をニンヒドリンにより誘導体化しているため、光学異性体の分析を行うことができない。そのため、HPLC による光学異性体の分析法として、アミノ酸をジアステレオマーに誘導体化し、オクタデシルシリカ (ODS) カラムを用いて分離を行う方法<sup>5)-7)</sup>や 9-フルオレニルメチルクロロホルメート (FMOC-Cl) 等を用いて誘導体化し、キラル固定相を用いて分離を行う方法<sup>8)9)</sup>が報告されている。しかし、プロリンは 2 級アミノ酸であるため、オルトフタルアルデヒド (OPA) と反応しないといった問題点や誘導体化の際に 1 級アミノ酸も同時に反応するので、これらの存在が測定に際して妨害となることや、様々な夾雑成分を含む食品ではプロリンの誘導体化が不十分となることが危惧される。そこで、本研究ではプロリンに選択的な前処理を行うために、OPA と FMOC-Cl を用いた 2 ステップ誘導体化法を考案した。更に、液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) によるプロリンの高感度かつ選択的なキラル分離・定量法について検討し、液状食品中の遊離のプロリンの測定を試みた。

## 2 実 験

## 2.1 試料及び試薬

試料は、市販されている清涼飲料水 6 種類、粉ミルク 5

<sup>1</sup> 星薬科大学薬品分析化学教室: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

<sup>2</sup> 埼玉県衛生研究所: 338-0824 埼玉県さいたま市桜区上大久保 639-1

Table 1 LC/MS conditions for proline and hydroxyproline analysis

LC conditions	
Mobile phase A	0.03% Acetic acid- 0.02% Triethylamine in MeOH
Mobile phase B	0.03% Acetic acid- 0.02% Triethylamine in CH <sub>3</sub> CN
Flow rate	0.5 mL min <sup>-1</sup> (A : B = 20 : 80)
Column temperature	30°C
Injection volume	10 µL
MS conditions	
Ionization	Electrospray
Mode	SIM negative ion
Monitoring ion	Proline ( <i>m/z</i> 114) <sup>13</sup> C <sub>5</sub> , <sup>15</sup> N-L-Proline ( <i>m/z</i> 120) Hydroxyproline ( <i>m/z</i> 130)
Capillary voltage	3000 V
Drying gas flow	N <sub>2</sub> (12 L min <sup>-1</sup> )
Drying gas temperature	350°C
Nebulizing gas pressure	35 psi
Fragmentor voltage	80 V

種類及び食酢 6 種類を使用した。標準品試薬として、L-(-)-プロリン (L-Pro) (試薬特級)、D-(+)-プロリン (D-Pro) (和光特級)、*trans*-ヒドロキシ-L-プロリン (L-Hyp) (試薬特級)、*cis*-4-ヒドロキシ-D-プロリン (D-Hyp) (>98%) は和光純薬製を用い、サロゲート物質には <sup>13</sup>C<sub>5</sub>, <sup>15</sup>N-L-プロリン (>98%) (ISOTEC 製) を使用した。誘導体化試薬として用いたオルトフタルアルデヒド (OPA) (生化学用) は和光純薬製、9-フルオレニルメチルクロロホルメート (FMOC-Cl) (>98%) は東京化成製を使用した。その他の試薬には和光純薬製を使用した。精製水は Milli-Q Gradient A10 (日本ミリポア製) により精製して用いた。前処理の固相抽出法には、メタノール 5 mL 及び精製水 5 mL を用いてプレコンディショニングした GL サイエンス製 Bond Elut C18 (500 mg, 3 mL), また、メタノール 1 mL 及び精製水 1 mL を用いてプレコンディショニングした Waters 製 Oasis HLB (30 mg, 1 mL) を使用した。

## 2・2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ質量分析計には Agilent 製 1100 series LC/MSD を用い、分析カラムには Astec 製 CYCLOBOND I 2000RN (4.6 mm I.D. × 250 mm) を使用した。機器の分析条件は Table 1 に示した。

## 2・3 試験溶液の調製

清涼飲料水及び食酢は、精製水で 20~400 倍に適宜希釈したものを試料とし、試料 500 µL にサロゲート (1 µg) を添加した後、試験溶液を調製した。また、粉ミルクは、精製水 1 mL 当たりタンパク質含量 0.5~5 mg になるよう

溶解し、サロゲート (1 µg) を添加した。その後、食品衛生検査指針<sup>10)</sup>に準じて除タンパク操作を行った。エタノール 3 mL を加え、遠心分離操作 (5000 rpm, 10 min) を行った。上澄みを分取し、残留物は 75% エタノール 400 µL により洗浄を行い、遠心分離後、上澄みを分取した。この洗浄操作を 3 回繰り返した。上澄みを合わせて減圧乾固した後、精製水 500 µL に再溶解し、試験溶液の調製を行った。OPA 誘導体化操作として、試料溶液に 1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.5) 500 µL 及び OPA 試薬 (3% OPA 及び 1.5% 2-メルカプトエタノール) 250 µL を加え、室温で 2 分間攪拌した。その後、反応液を Bond Elut C18 へと負荷した。流出液を分取し、更に、5% メタノール水溶液 2 mL で溶出を行い、流出液及び溶出液を合わせ、5 mL に定容した。定容した 5 mL から 200 µL 分取し、40°C で減圧下、乾固した後、精製水 200 µL で再溶解し、FMOC-Cl による誘導体化を行った。すなわち、試料溶液 200 µL に 1 M ホウ酸緩衝液 (pH 7.7) 50 µL 及び 15 mM FMOC-Cl 250 µL を加え、室温で 40 秒間攪拌した。次に過剰量の FMOC-Cl を除去するためにペンタン 2 mL で 2 回洗浄した。また、試料中での存在が微量な D 体を高感度に測定するため、Bond Elut C18 によるクリーンアップ処理後に定容した試料溶液から別に 4 mL 取り、減圧乾固した。その後、精製水 200 µL で再溶解し、FMOC-Cl による誘導体化を行った。試料溶液 200 µL に 2% ギ酸 1 mL を加え、Oasis HLB へと負荷した。洗浄溶媒として精製水 2 mL を流した後、5% アンモニア含有メタノールを 2 mL 流すことで、カードリッジからの溶出を行った。溶出液を減圧乾固し、溶解液 (メタノール : アセトニトリル = 20 : 80) 200 µL で再溶解して、試験溶液とした。

なお、試料中の光学純度の表記については長田ら<sup>11)</sup>に従って、%D = D/(D+L) とした。

## 3 結果及び考察

### 3・1 測定条件の検討

アミノ酸の多くは紫外 (UV) 吸収や発蛍光性などの物性を有していないため、UV 吸収や発蛍光性を有する物質への誘導体化など様々な方法が用いられている<sup>12)~15)</sup>。また、アミノ酸は両極性化合物であることから、極性が高く、汎用されている逆相系の ODS カラムでは保持が困難であり、極性を低くするためにも誘導体化が行われている。本研究では、保持を改善するために FMOC-Cl による誘導体化を行った後、キラルカラムによる光学分離を行った。本研究で各種のキラルカラムを検討した結果、R-ナフチルエチルカルバメート誘導体化された β-シクロデキストリンを固定相とした、CYCLOBOND I 2000RN が FMOC 誘導体化したプロリンのキラル分離に最適であった。また、検出には検出感度、選択性に優れた質量分析計 (MS) を用

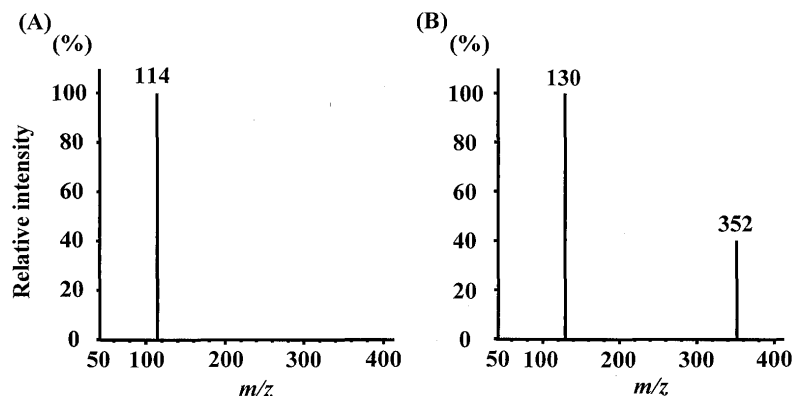


Fig. 1 MS spectra of proline and hydroxyproline  
(A) Proline, (B) Hydroxyproline

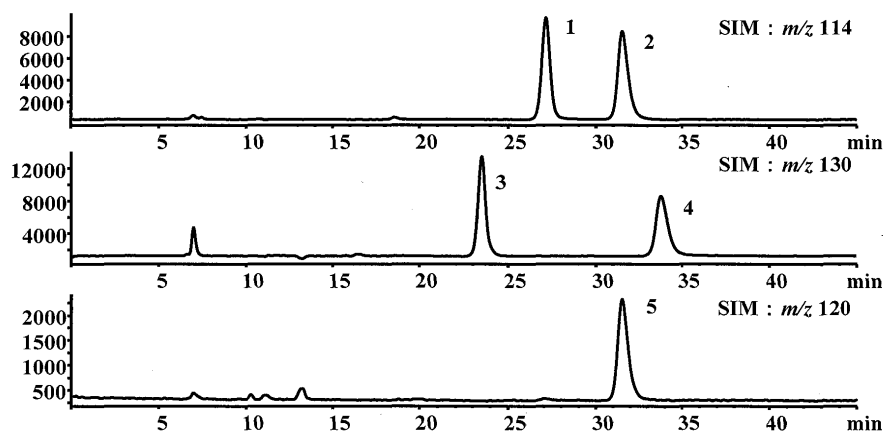


Fig. 2 SIM chromatograms of standard ( $750 \text{ ng mL}^{-1}$ ) of proline and hydroxyproline  
Peak number; (1) D-proline, (2) L-proline, (3) D-hydroxyproline, (4) L-hydroxyproline,  
(5)  $^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}$ -L-proline

いることにした。MSを用いることで、紫外可視吸光検出器では測定が困難であった食品においても夾雑成分の影響をあまり受けずに測定が行えるため、食品中での存在が微量なD体の測定が可能となった。

LCの移動相条件を検討するために、有機溶媒としてアセトニトリル-メタノール混液を用い、pH調整のための緩衝液を加えずに測定を行ったところ、保持が強く、測定時間が長時間となった。そのため、緩衝液として酢酸及びトリエチルアミンを用いた。その結果、緩衝液の濃度が高くなるにつれ、保持時間は短くなり、シャープなピークが得られることが分かった。しかし、対象物質のイオン化に影響が生じ、質量分析計による測定においてピーク面積としては減少した。逆に緩衝液の濃度を低くすると、保持時間が長くなり、ピーク形状はブロードになった。この緩衝液の濃度による保持時間への影響は、固定相と対象物質の水素結合<sup>16)17)</sup>に対して競合が生じたためであると考えられた。種々検討の結果、Table 1に示すLC条件を最適条件

として設定した。

MSの測定条件として、FMOc誘導体化したプロリンのイオン化について検討したところ、エレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI) を用い、ネガティブイオンモードでプロリン及びヒドロキシプロリンが良好にイオン化されることが分かった。マススペクトルを測定した結果をFig. 1に、また、プロリン ( $m/z$  114),  $^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}$ -L-プロリン ( $m/z$  120) 及びヒドロキシプロリン ( $m/z$  130) のそれぞれの選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) クロマトグラム (標準品) をFig. 2に示した。

濃度を変えた標準溶液を調製し、内標準物質  $^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}$ -L-プロリンに対する相対面積比から検量線を作成したところ、プロリン (濃度範囲:  $25 \sim 1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ), ヒドロキシプロリン (D-Hyp:  $50 \sim 1000 \text{ ng mL}^{-1}$ , L-Hyp:  $100 \sim 1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ) は共に相関係数は0.997以上と良好な直線性が得られ、定量限界 ( $S/N > 10$ ) は  $25 \sim 100 \text{ ng mL}^{-1}$

であった (Table 2).

### 3・2 試験溶液の調製

FMOC は 1 級及び 2 級アミンと反応するため、プロリンの FMOC 誘導体化を行う際、1 級アミノ酸をはじめとする、様々なアミン類も同時に誘導体化される。また、中でも 1 級アミノ酸である L-ロイシン (M.W. = 131.17) と L-イソロイシン (M.W. = 131.17) の FMOC 誘導体は、保持時間が D-ヒドロキシプロリン (M.W. = 131.13) の FMOC 誘導体の保持時間と近く、更にこれらの分子量もほぼ等しいため、D-ヒドロキシプロリンの検出において妨害影響を与えることが懸念された。実際、ロイシン、イソロイシンが大量に含まれた食品を試料として FMOC 誘導体化のみで分析したところ、D-ヒドロキシプロリンの検出において L-ロイシンと L-イソロイシンによる妨害影響が認められた。また、複雑なマトリックスから構成される食品には、1 級アミノ酸をはじめ、様々な物質が含まれているため、クリーンアップが不十分であった場合、MS のイオン化に際してのイオンサプレッションや、共存物質を原因とする誘導体化効率の低下、更に、LC カラムの劣化促進などが生じることが危惧された。そのため、プロリンの十分な誘導体化を行うために、1 級アミンを除去する必要があった。そこで、OPA が 1 級アミンとのみ反応する性質を利用し

て、1 級アミンを OPA 誘導体化し、逆相系である Bond Elut C18 カートリッジに保持させた。OPA 誘導体化操作としては、Monboisse ら<sup>18)</sup>の方法を参考にした。分析対象であるプロリン及びヒドロキシプロリンは 2 級アミノ酸であるため、OPA で誘導体化されず、Bond Elut C18 カートリッジには保持されない。その結果、この前処理により、1 級アミノ酸と 2 級アミノ酸であるプロリンとの固相抽出法による分離が可能となり、2 級アミノ酸の選択的な前処理を行うことができた。次に、Einarsson ら<sup>19)</sup>の方法を参考に、Bond Elut C18 カートリッジで分画した 2 級アミノ酸の FMOC 誘導体化を行い、更に Oasis HLB カートリッジを用いてクリーンアップを行った。FMOC 誘導体化することでプロリンの極性が低下し、Oasis HLB カートリッジ処理において、試料溶液中に 2% ギ酸を添加して FMOC-プロリンを分子形にすることにより、カートリッジへの十分な保持が得られた。Oasis HLB カートリッジを用いた固相抽出を行うことで、誘導体化の際に用いたホウ酸塩や試料中に含まれる高極性の夾雑成分の除去が可能となった。この OPA と FMOC-Cl を用いた 2 ステップ誘導体化法により 2 級アミノ酸の選択的なクリーンアップが効果的に達成された。

### 3・3 実試料への応用

試料として、清涼飲料水、粉ミルク、食酢を用い、添加回収試験を行った結果、平均回収率は 80~104% 以内と良好であり、また、相対標準偏差は 7.0% 以内と高精度な測定が達成された (Table 3)。特に、L-プロリンは安定同位体を内標準物質に用いているため、良好な回収率が得られ、保持時間が近い L-ヒドロキシプロリンも十分な補正が行われた。本法を用いて市販されている清涼飲料水 6 種類、粉ミルク 5 種類及び食酢 6 種類について遊離のプロリン及びヒドロキシプロリンの含有量を測定した。その際のクロマトグラムを Fig. 3 に示す。ヒドロキシプロリンについてはいずれの検体からも検出されなかったが、ほぼ

Table 2 Validation of LC/MS analysis

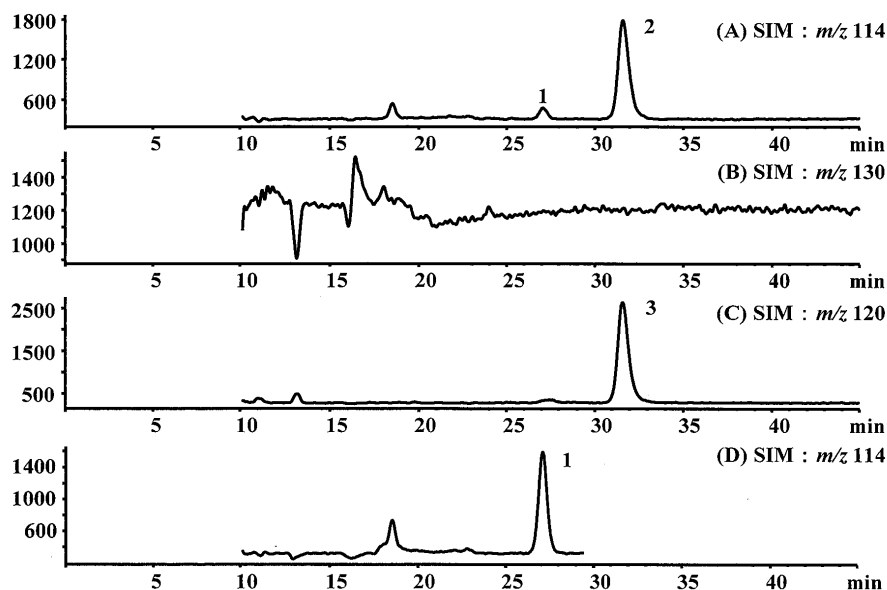
	LOD/ ng mL <sup>-1</sup>	LOQ/ ng mL <sup>-1</sup>	Range/ ng mL <sup>-1</sup>	Correlation coefficient (r)
D-Pro	10	25	25~1000	0.999
L-Pro	10	25	25~1000	0.999
D-Hyp	20	50	50~1000	0.997
L-Hyp	40	100	100~1000	0.999

LOD: Limit of detection ( $S/N = 3$ ), LOQ: Limit of quantification ( $S/N > 10$ ) D-Pro: D-Proline, L-Pro: L-Proline, D-Hyp: D-Hydroxyproline, L-Hyp: L-Hydroxyproline

Table 3 Recoveries of proline and hydroxyproline from various foods

Sample	Recovery, % (R.S.D., %)			
	D-Pro 150 ng mL <sup>-1</sup> added	L-Pro 300 ng mL <sup>-1</sup> added	D-Hyp 100 ng mL <sup>-1</sup> added	L-Hyp 200 ng mL <sup>-1</sup> added
Soft drink	97.3 (2.2)	97.7 (2.5)	84.5 (5.4)	95.8 (7.0)
Infant formula	86.9 (2.5)	98.1 (2.1)	80.1 (2.5)	94.7 (2.4)
Vinegar	104.0 (1.9)	99.3 (2.4)	84.9 (3.5)	98.9 (1.6)

n = 4



**Fig. 3** Typical chromatograms for proline and hydroxyproline in vinegar  
 These chromatograms were obtained from vinegar 3. Chromatogram D is highly-concentrated sample for quantitation of D-proline. Peak number; (1) D-proline, (2) L-proline, (3)  $^{13}\text{C}_5$ ,  $^{15}\text{N}$ -L-proline

**Table 4** Concentration of proline and hydroxyproline in food samples

Sample		D-Pro	L-Pro	D-Hyp	L-Hyp
Soft drink	1	N.D.	598.2	N.D.	N.D.
	2	N.D.	142.7	N.D.	N.D.
	3	N.D.	124.7	N.D.	N.D.
	4	0.17	11.3	N.D.	N.D.
	5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Infant formula	1	N.D.	31.8	N.D.	N.D.
	2	N.D.	19.7	N.D.	N.D.
	3	N.D.	24.6	N.D.	N.D.
	4	N.D.	18.1	N.D.	N.D.
	5	N.D.	45.5	N.D.	N.D.
Vinegar	1	N.D.	12.3	N.D.	N.D.
	2	N.D.	18.1	N.D.	N.D.
	3	24.1	408.0	N.D.	N.D.
	4	21.4	877.7	N.D.	N.D.
	5	13.3	825.3	N.D.	N.D.
	6	N.D.	48.4	N.D.	N.D.

$\mu\text{g mL}^{-1}$ ; N.D.: not detected

すべての検体からL-プロリンが検出された (Table 4)。一方、D-プロリンは粉ミルクからは検出されなかったが、清涼飲料水では1検体 ( $0.17 \mu\text{g mL}^{-1}$ )、食酢では3検体 ( $13.3 \sim 24.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) から、1.5~5.6%Dの割合でD-プロリンが検出された。今回、D-プロリンが検出された検体は、そのほとんどが中国産であった。特に、食酢の3検体からはL-プロリンも多量に検出されたことから、精製が不十分なL-プロリンが添加物として使用されていた可能性

も考えられた。また、食酢は製造段階において発酵の操作<sup>20)</sup>を行っているため、その際に、D体が生成したのではないかと考えられ、更に精査する必要があると考えられる。

#### 4 結 言

OPAとFMOC-Clを使用した選択的な前処理操作を行い、LC/MSによるプロリンの高感度かつ選択的なキラル分離・定量法の構築を試みた。2ステップ誘導体化法により試料のクリーンアップが効果的に行われ、LC/MS装置への汚染も少ない、選択的な前処理が可能となった。また、キラルカラムを用いることで、プロリンの良好な光学異性体分離が達成された。市販されている清涼飲料水6種類、粉ミルク5種類及び食酢6種類について、プロリンの測定に適用した結果、ほぼすべての検体からL-プロリンが検出された。清涼飲料水は1検体、食酢は3検体から、1.5~5.6%DのD-プロリンが検出された。

本法は液状食品中のプロリンを光学分離、測定することが可能であり、食品添加物として使用されるプロリンの安全性を確保するための有効な分析法の一つになるものと期待される。

#### 文 献

- 1) 鈴木郁生, 野島庄七, 谷村顕雄監修: “第7版 食品添加物公定書解説書”, D-1213 (1999), (廣川書店)。
- 2) Cherkin A., J. L. Davis, M. W. Garman: *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **8**, 623 (1978)。
- 3) 厚生労働省: “輸入届出における代表的な食品衛生

- 法違反事例”, available from < [http://www1.mhlw.go.jp/topics/ysk\\_13/tp0419-1q.html](http://www1.mhlw.go.jp/topics/ysk_13/tp0419-1q.html) >.
- 4) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解 2005”, p. 176 (2005), (金原出版).
  - 5) H. Bückner, S. Haasmann, M. Langer, T. Westhauser, R. Wittner: *J. Chromatogr.*, **666**, 259 (1994).
  - 6) S. Rubio-Barroso, M. J. Santos-Delgado, C. Martín-Oliver, L. M. Polo-Díez: *J. Dairy Sci.*, **89**, 82 (2006).
  - 7) D. Jin, K. Nagakura, S. Murofushi, T. Miyahara: *J. Chromatogr.*, **822**, 215 (1998).
  - 8) M. Pawlowska, D. W. Armstrong: *Chirality*, **6**, 270 (1994).
  - 9) K. Hamase: *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 503 (2007).
  - 10) 厚生労働省監修: “食品衛生検査指針 食品添加物編 2003”, p. 244 (2003), (日本食品衛生協会).
  - 11) Y. Nagata, M. Higashi, Y. Ishii, H. Sano, M. Tanigawa, K. Nagata, K. Noguchi, M. Urade: *Life Sciences*, **78**, 1677 (2006).
  - 12) J. Zukowski, M. Pawlowska, D. W. Armstrong: *J. Chromatogr.*, **623**, 33 (1992).
  - 13) Y. Watanabe, K. Imai: *J. Chromatogr.*, **239**, 723 (1982).
  - 14) M. Pawlowska, S. Chen, D. W. Armstrong: *J. Chromatogr.*, **641**, 257 (1993).
  - 15) 浜瀬健司, 財津 潔: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53**, 677 (2004).
  - 16) 大井尚文著: “キラルクロマトグラフィーの進歩”, p. 8 (2000), (キラルクロマトグラフィー研究所).
  - 17) D. W. Armstrong, C.-D. Chang, S. H. Lee: *J. Chromatogr.*, **539**, 83 (1991).
  - 18) V. Monboisse, J. C. Monboisse, J. P. Borel, A. Randoux: *Anal. Biochem.*, **176**, 395 (1989).
  - 19) S. Einarsson, B. Josefsson, S. Lagerkvist: *J. Chromatogr.*, **282**, 609 (1983).
  - 20) 飴山 實, 大塚滋編: “酢の科学”, p. 43 (1990), (朝倉書店).

## Enantiomeric Determination of Proline in Liquid Food by High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry

Jun KOHAMA<sup>1</sup>, Koichi SAITO<sup>1</sup>, Hironori SAKAMOTO<sup>1</sup>, Yusuke IWASAKI<sup>1</sup>,  
Rie ITO<sup>1</sup>, Masakazu HORIE<sup>2</sup> and Hiroyuki NAKAZAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

<sup>2</sup> Saitama Prefectural Institute of Public Health, 639-1, Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi, Saitama 338-0824

(Received 19 July 2007, Accepted 25 September 2007)

For the chiral separation and quantification of L-proline used as a food additive, a selective pretreatment method that uses *o*-phthalaldehyde (OPA) and 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) was examined, and HPLC/MS with high sensitivity and high selectivity was developed. Primary amino acids, which exist in liquid foods as impurities, were derivatized with OPA, followed by separation from proline with a solid-phase extraction cartridge. The secondary amino acids were converted into FMOC derivatives. Sample cleanup was achieved with this two-step derivatization method, and a selective pretreatment of secondary amino acids became possible. An excellent means to separate the optical isomer of proline was achieved using a chiral column made of a  $\beta$ -cyclodextrin phase in the polar organic phase mode. The average recovery rates of proline from soft drink, infant formula, and vinegar were as high as 80% to 104%. Using this method, proline in liquid food can be separated optically and determined. This method is expected to be of use in determining of the safety of proline used as a food additive.

**Keywords** : chiral separation ; proline ; derivatization ; solid phase extraction ; LC/MS.