

技術論文

アミノ酸 (ピバロイル/イソプロピルエステル誘導体) の
GC/MS による解析*

力石嘉人**・高野淑識**・大河内直彦**

(2008 年 12 月 12 日受付, 2009 年 4 月 6 日受理)

1. はじめに

アミノ酸はアミノ基 (-NH₂) とカルボキシル基 (-COOH) を持つ有機化合物であり, 生物の生合成・代謝・生理機能に深く関わる。生体中で合成される多くのアミノ酸は, α 位の炭素原子に, カルボキシル基, アミノ基, 水素, 側鎖の 4 つの異なる原子 (団) が結合した α -アミノ酸であり, D-体・L-体の光学異性体が存在する。地球の生物はタンパク質の基本構造として Fig. 1 に挙げた 20 種類の L- α -アミノ酸を用いるが, 極少量の D- α -アミノ酸や, 非タンパク性の β , γ -アミノ酸なども生命活動の維持に欠かせない。さらにアミノ酸は, 炭素質隕石などの地球外物質中にも存在し, その存在量や異性体の偏りに関する研究が報告されてきた (例えば, Kvenvolden and Kaplan, 1970; Shimoyama et al, 1979; Cronin and Pizzarello, 1997; Pizzarello and Cronin, 1998)。また, とくにこの数年間においては, 生物のアミノ酸 (グルタミン酸やフェニルアラニン) の安定窒素同位体比が, その生物の栄養段階や食物連鎖網のベースにある生物 (一次生産者) の同位体比を正確に見積ることが出来る優れたツールであることが見いだされ (力石ら, 2007), 生物・生態学研究を中心に積極的に使われるようになった。

GC/MS によるアミノ酸の分析手順は, 一般的に, (1) 試料の酸加水分解, (2) 精製と誘導体

化, (3) GC/MS による測定で構成される。アミノ酸に揮発性を持たせるために様々な誘導体化法が用いられており, *tert*-ブチルジメチルシリル化 (*t*BDMS: 例えば, MacKenzie et al., 1987) トリフルオロアシル/イソプロピルエステル化 (TFA/iPr: 例えば, Engel et al., 1990), ペンタフルオロアシル/イソプロピルエステル化 (PFA/iPr: 例えば, Pelz et al., 1998), ピバロイル/イソプロピルエステル化 (Pv/iPr: 例えば, Metges et al., 1996), エトキシカルボニル/エチルエステル化 (EtOC/Et: 例えば, Montigon et al., 2001) などが一般的である。

本報では, ピバロイル/イソプロピルエステル誘導体化とその GC/MS 分析法 (同定法) を紹介する。この誘導体化法は, (1) 誘導体基にケイ素やフッ素を含まない, (2) 誘導体基の炭素数が比較的多い, (3) 誘導体化体アミノ酸が比較的安定であるという特徴がある。そのため, ガスクロマトグラフ/同位体比質量分析計 (GC/IRMS) を用いた安定窒素同位体比分析において, とても使いやすい誘導体化法である。

2. 試料

代表試料として, 静岡県賀茂郡松崎町的那賀川で採取した緑藻 (カワノリ, *Prasiola japonica*), 北海道伊達市の北黄金遺跡で出土した縄文時代前期 (約 5500-5700BP) の人骨のコラーゲン, 「ち

*GC/MS analysis of amino acids as pivaloyl/isopropylesters

**独立行政法人海洋研究開発機構, 海洋・極限環境生物圏領域, 〒 237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15 Yoshito Chikaraishi, Yoshinori Takano and Naohiko Ohkouchi: Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology 2-15 Natsushima-cho, Yokosuka, 237-0061, Japan
e-mail: ychikaraishi@jamstec.go.jp, Tel: 046-867-9778, Fax: 046-867-9775

Table 1. Summary of retention time and prominent fragment ions for pivaloyl/amino acid/isopropylesters

No.	Compound	Abbreviation	formula	Molecular weight underivative	derivative	Retention time (min)	Prominent fragment ions (<i>m/z</i>)	Level of identification**
1	Alanine	Ala	C ₃ H ₇ NO ₂	89	215	15.7	128, 85, 57	4
2	Glycine	Gly	C ₂ H ₅ NO ₂	75	201	16.5	114, 85, 57	4
3	Isovaline*	iVal	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117	243	16.8	156, 57	-
4	2-aminobutyric acid*	2-ABA	C ₄ H ₉ NO ₂	103	229	17.4	142, 85, 57	-
5	Sarcosine*	Sar	C ₃ H ₇ NO ₂	89	215	17.9	128, 88, 85, 57	-
6	β-Alanine*	β-Ala	C ₃ H ₇ NO ₂	89	215	18.0	156, 130, 128, 98, 57	4
7	Valine	Val	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117	243	18.2	156, 57	-
8	3-Aminoisobutyric acid*	3-AiBA	C ₄ H ₉ NO ₂	103	229	17.4	170, 144, 141, 130, 112, 57	4
9	Leucine	Leu	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131	257	19.8	170, 85, 57	4
10	Isoleucine	Ile	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131	257	20.1	170, 85, 57	4
11	4-aminobutyric acid*	GABA	C ₄ H ₉ NO ₂	131	257	21.1	144, 112, 86, 57	4
12	Proline	Pro	C ₅ H ₉ NO ₂	115	241	22.2	154, 85, 70, 57	4
13	Aspartic acid	Asp	C ₄ H ₇ NO ₄	133	301	24.5	214, 172, 160, 85, 57	4
14	Threonine	Thr	C ₄ H ₉ NO ₃	119	329	24.6	140, 85, 57	4
15	Serine	Ser	C ₃ H ₇ NO ₃	105	315	25.1	126, 85, 57	4
16	δ-Aminolevulinic acid*	5-ALA	C ₅ H ₉ NO ₃	131	257	25.2	198, 101, 85, 57	4
17	Methionine	Met	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149	275	25.4	201, 159, 141, 85, 57	4
18	Glutamic acid	Glu	C ₅ H ₉ NO ₄	147	315	27.0	228, 186, 174, 84, 57	4
19	Phenylalanine	Phe	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165	291	27.8	204, 190, 148, 57	4
20	2-Aminooadipic acid*	2-AAA	C ₆ H ₁₁ NO ₄	161	329	27.0	242, 20, 186, 98, 57	4
21	Hydroxyproline*	Hyp	C ₅ H ₉ NO ₃	131	325	29.9	282, 239, 152, 85, 68, 57	4
22	Lysine	Lys	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146	356	35.2	271, 168, 57	4
23	Tyrosine	Tyr	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181	391	36.9	290, 206, 85, 57	4

Peak numbers refer to chromatogram in Fig. 2 (iVal, Sar, 2-ABA, and 3-AiBA were obtained by authentic standards, but not found in the samples presented in this paper) and spectra in Fig. 3

*: Non-protein amino acid (IUPAC name in bracket)

**:. All compounds are identified by coincidence in GC retention time and mass spectra with those of authentic standards

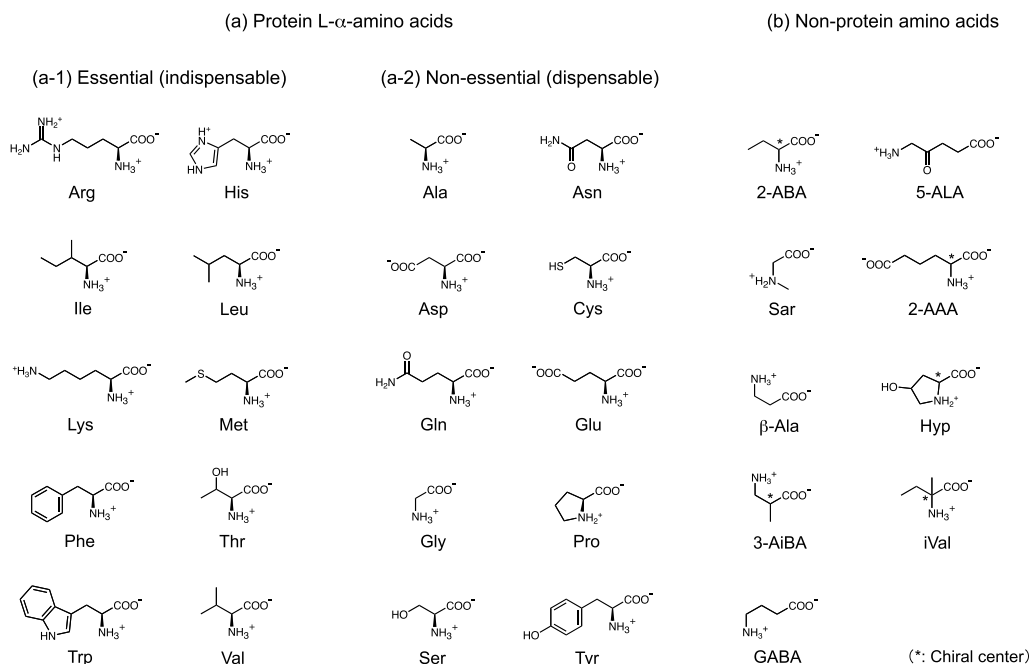


Fig. 1. Chemical structures of amino acids: (a-1) essential and (a-2) non-essential protein L- α -amino acids, and (b) typical non-protein amino acids. Abbreviations refer in Table 1.

きゅう」試験掘削航海 (CK-06-06) において下北沖海底から採取したメタンハイドレート層を含む海洋堆積物 (コア番号 24-4, 深度 212.9m: Aoike, 2007) の分析結果を示す。

3. 分析方法

3.1. アミノ酸の抽出と誘導体化

アミノ酸の抽出・ピバロイル/イソプロピルエステル誘導体化の分析手順を Fig. 2 に示す。まず乾燥試料 (緑藻・人骨コラーゲンは 1mg, 海洋堆積物は 120mg) を, 12 規定 (12mol/l) 塩酸で酸加水分解し (100℃, 12 ~ 24 時間), 試料に含まれるタンパク質をアミノ酸へ分解した。加水分解溶液を有機溶媒 (ジクロロメタン/*n*-ヘキサン) での液-液抽出により脱脂した後, メタノールを加え, 窒素ガス気流下で乾固した。塩化チオニル/イソプロパノール (110℃, 2 時間) でイソプロピルエステル化し, 続いて, 塩化ピバロイル/ジクロロメタン (110℃, 2 時間) でピバロイル化し, 最後に水-有機溶媒 (ジクロロメタン/*n*-ヘキサン) での液-液抽出により, アミノ酸のピバロイル/イ

ソプロピルエステル誘導体化体を得た。なお本手法では, 加水分解の過程で, アスパラギン・グルタミンはそれぞれアスパラギン酸・グルタミン酸に変換される。また, アルギニン・システイン・ヒスチジン・トリプトファンなどのアミノ酸も検出されない。Table 1 に示すアミノ酸については, おおむね 90% 以上の回収率で得られるが, プロリンの回収率は 10% 以下である。

3.2. GC/MS 分析

GC/MS 分析は, Agilent HP 6890 ガスクロマトグラフ/HP MSD 5973N 質量分析計を用いた。導入法は PTV 法を用い, 50℃ で 0.2 分間保持し, 350℃ まで 600℃/分で昇温した後, 350℃ で 10 分間保持した。分析カラムは, J&W HP-5MS (30m 長, 0.25mm 径, 0.15 μ m 膜厚) を使用し, 40℃ で 4 分間保持し, 90℃ まで 10℃/分で昇温し, 90℃ から 220℃ まで 5℃/分で昇温した後, 220℃ で 10 分間保持した。キャリアーガスの流速は, 1.4ml/分の定流速 (constant flow) モードで使用した。

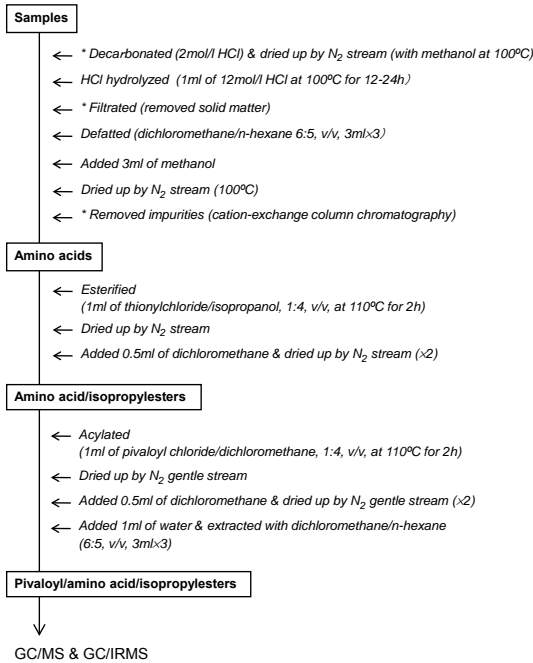


Fig. 2. Extraction and derivatization procedures of amino acids. Asterisks indicates optional processes.

4. 分析結果

Fig. 3 に、各試料の分析で得られた TIC クロマトグラムを、Table 1 同定レベルを示す。アミノ酸のピバロイル/イソプロピルエステル誘導体の基本的なマススペクトルは、親イオン [M] に加え、プロピル基が脱離した [M-43]、プロピルエステル基が脱離した [M-59]、カルボニル基が脱離した [M-87]、及び、ピバロイル基 [85]、*tert*-ブチル基 [57] に対応したイオンフラグメントを示す (Fig. 4)。なお、これらの基本的なもの以外で、個々のアミノ酸に特異的なフラグメントがある場合は、Fig.4 の構造式に特記した。

例えば、アラニンのマススペクトルは、[M]⁺ が m/z 215 であり、[M-43]⁺、[M-59]⁺、[M-87]⁺ に対応する m/z 172、 m/z 156、 m/z 128、ピバロイル基と *tert*-ブチル基に対応する m/z 85、 m/z 57 を持つ (Fig. 4, No. 1)。イソロイシンのマススペクトルは、[M]⁺ が m/z 257 であり、[M-43]⁺、[M-59]⁺、[M-87]⁺ に対応する m/z 214、 m/z 198、 m/z 170、

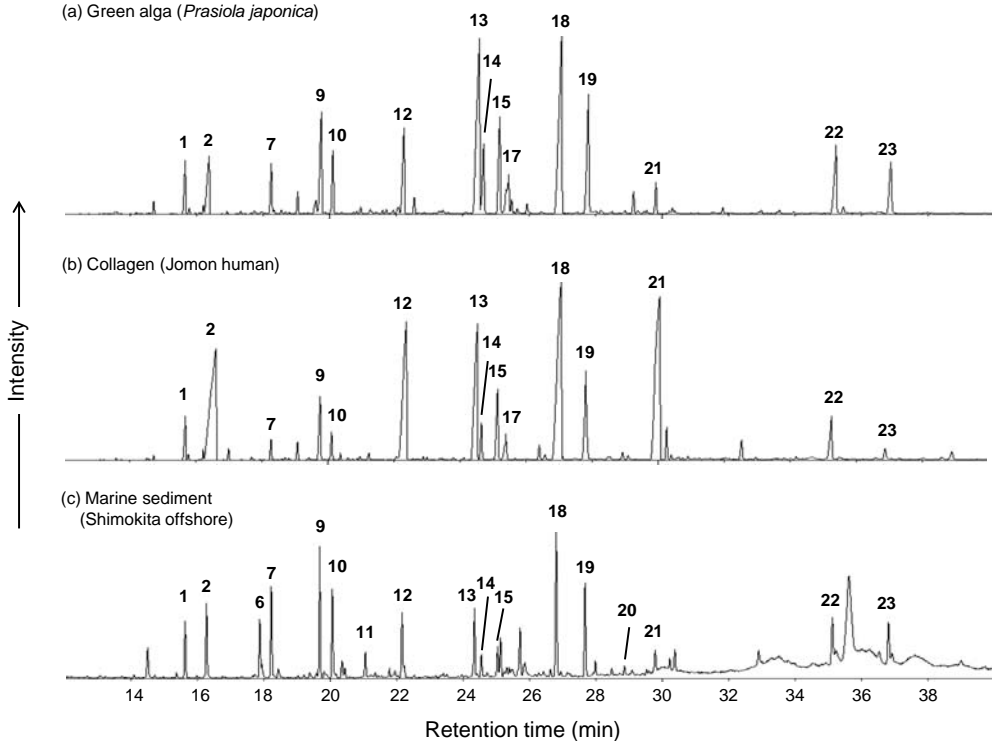


Fig. 3. TIC chromatograms of amino acids from (a) green alga, (b) human collagen, and (c) marine sediment. Peak numbers correspond to the compound numbers in Table 1 and Fig. 4.

Fig. 4. (1/5)

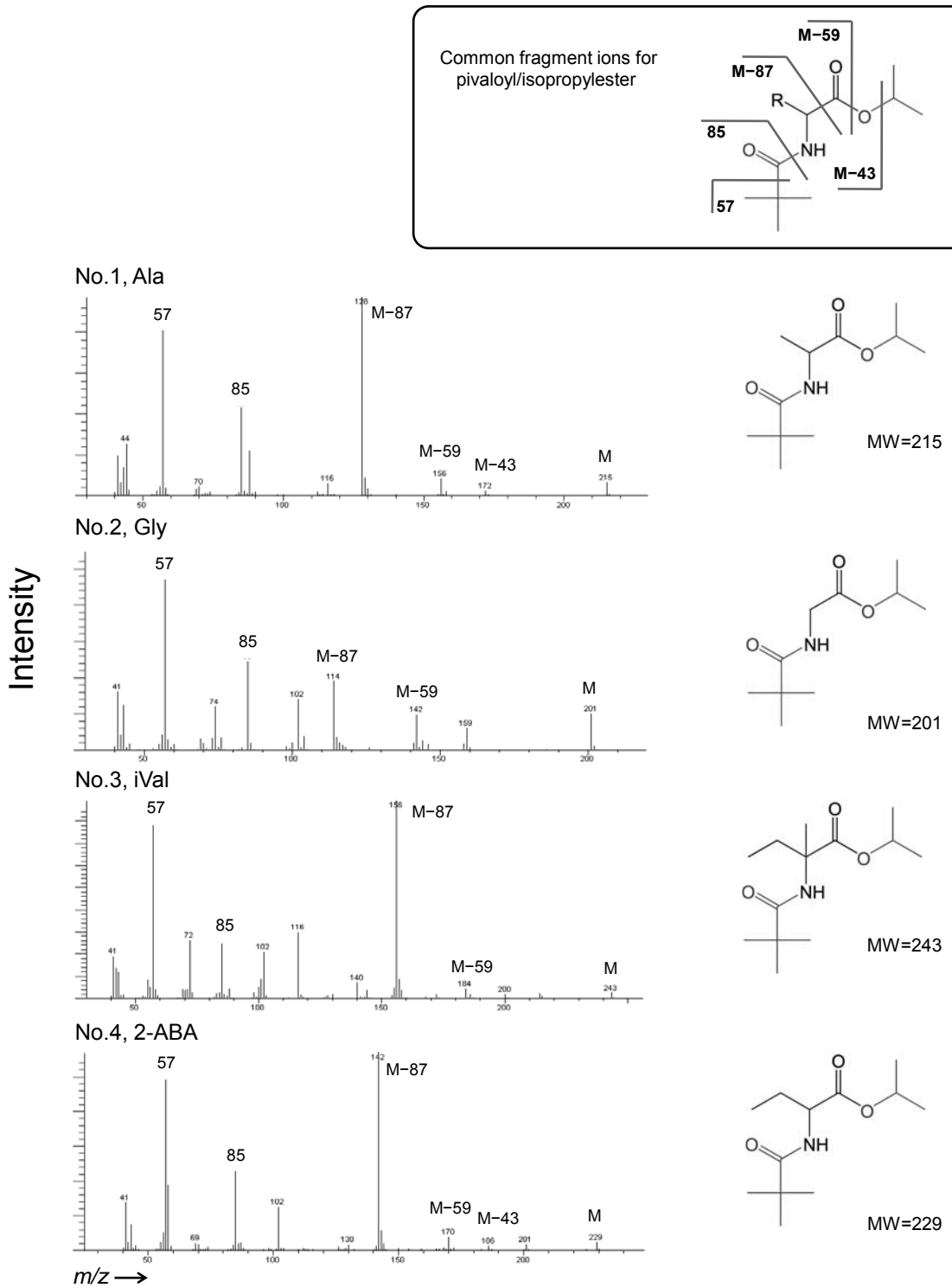


Fig. 4. Mass spectra of amino acids as pivaloyl/isopropylester derivatives. Compound numbers correspond to the compound numbers in Table 1 and the peak numbers in Fig. 3.

Fig. 4. (2/5)

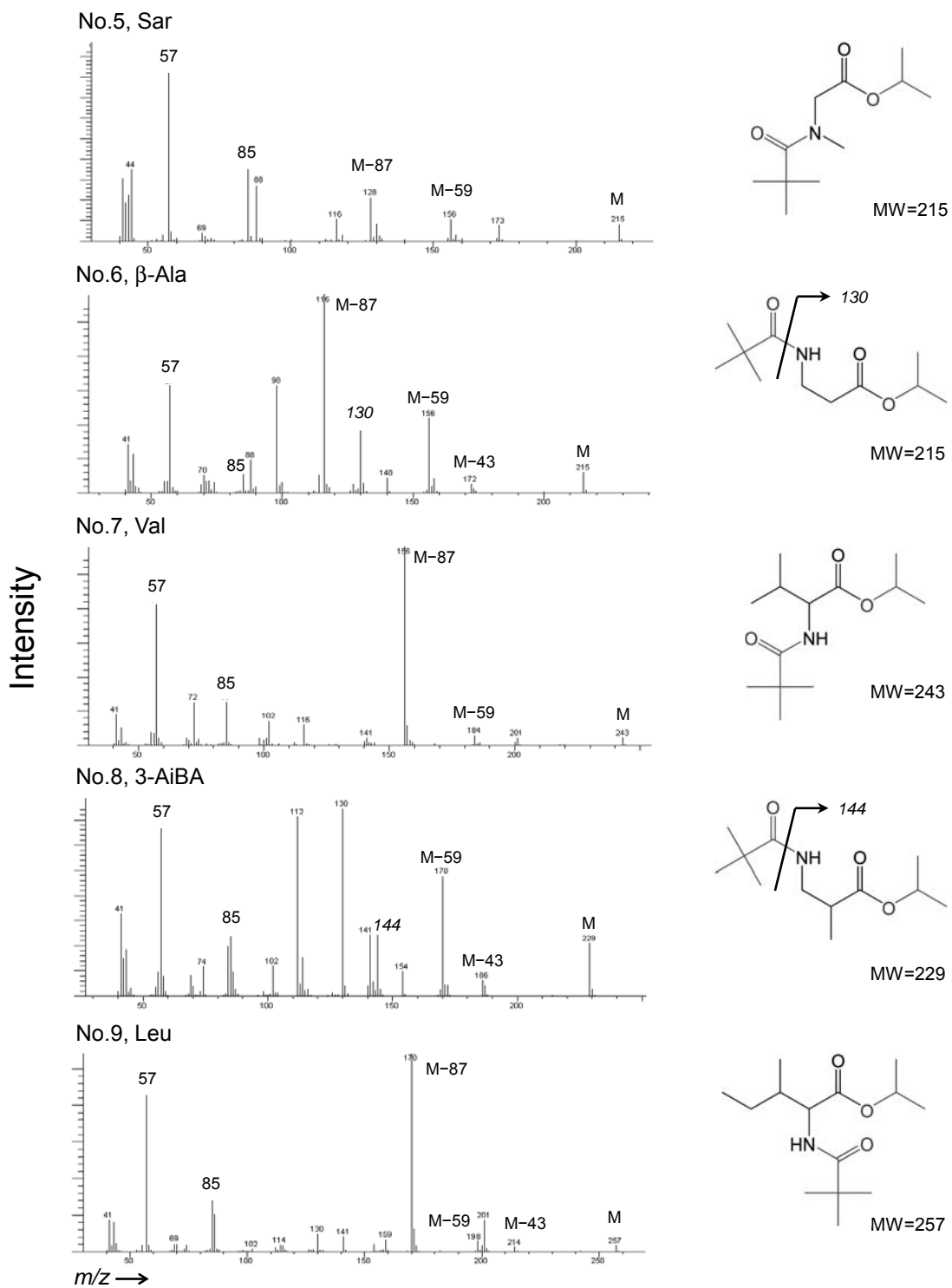


Fig. 4. (3/5)

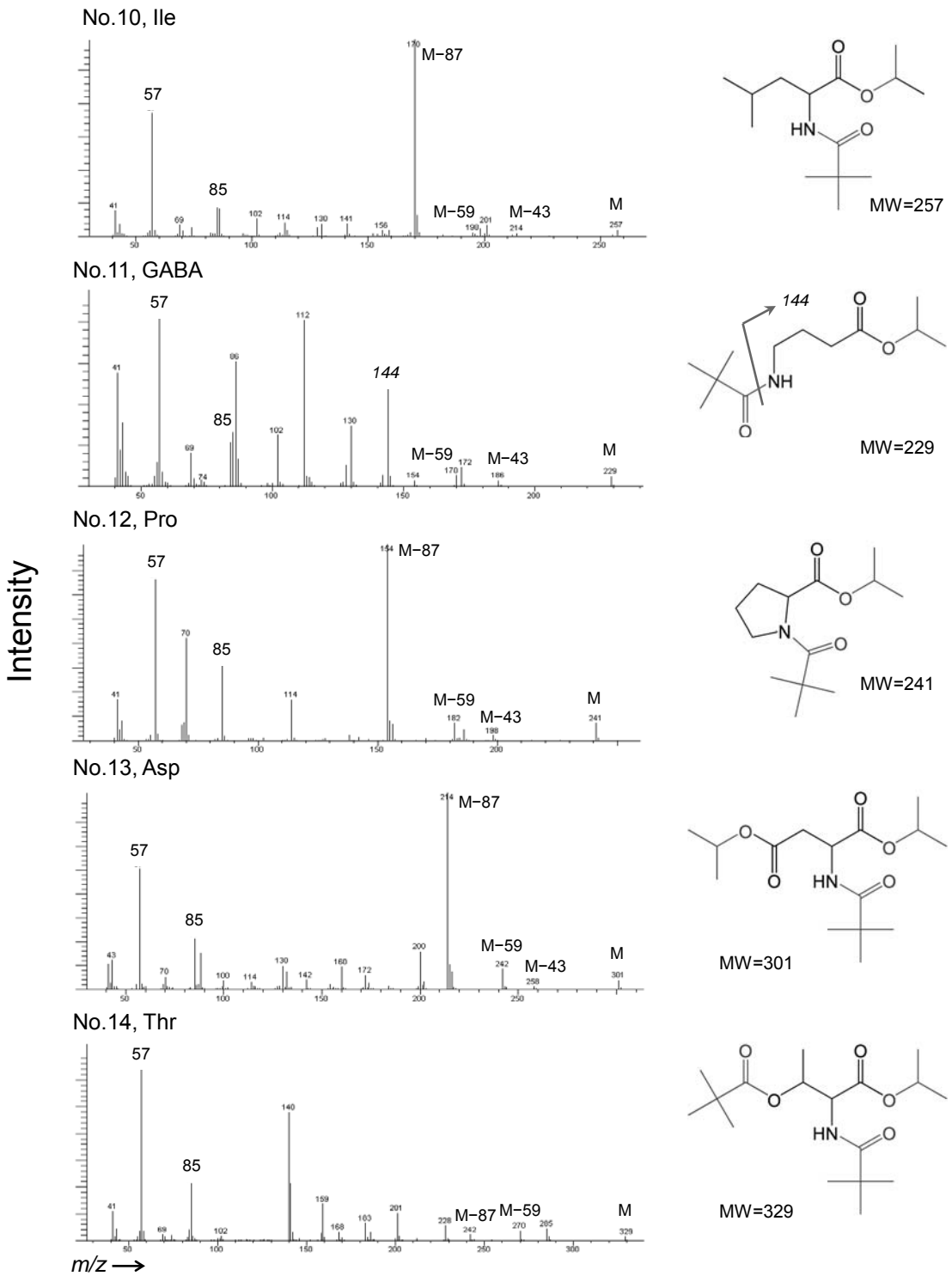


Fig. 4. (4/5)

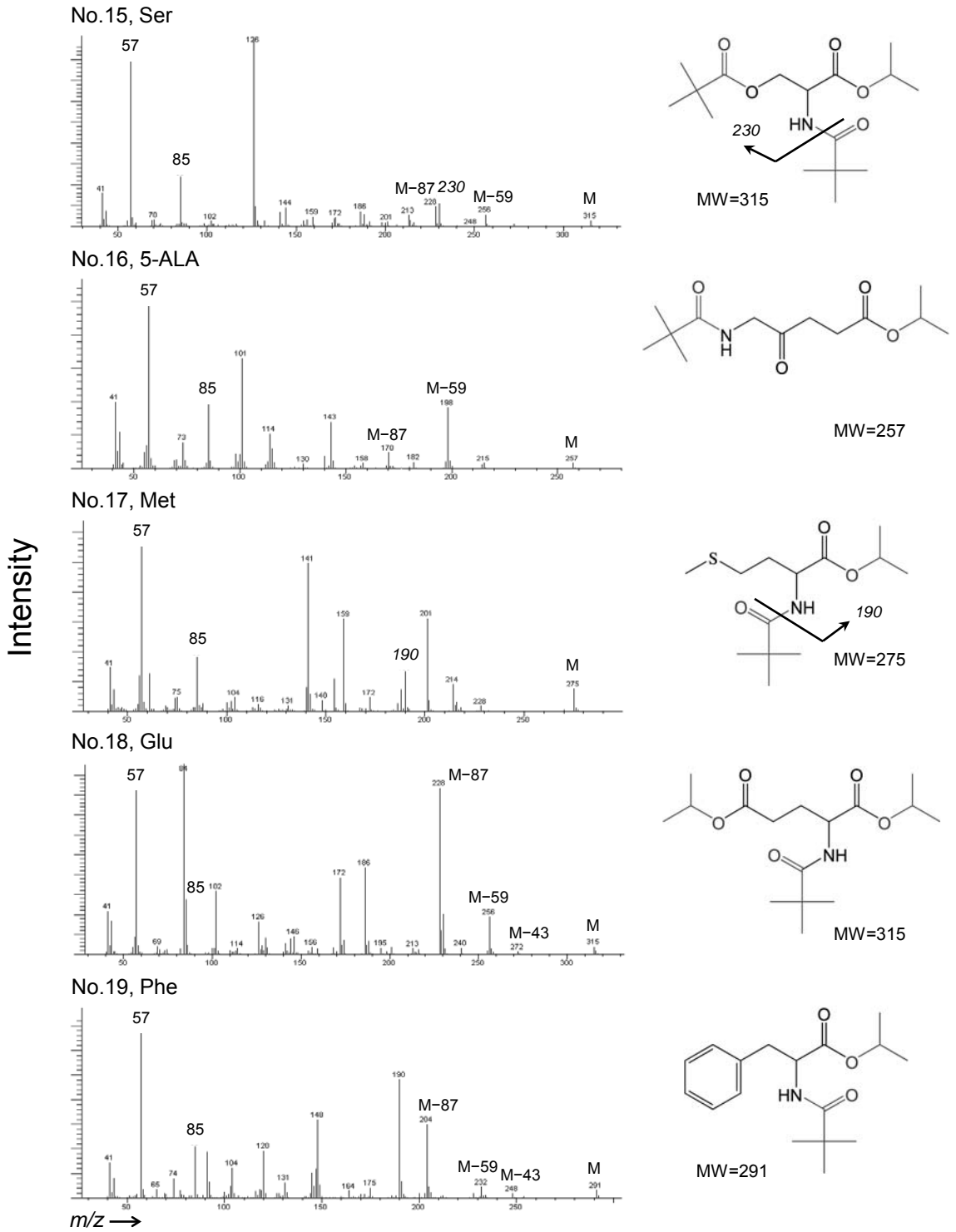
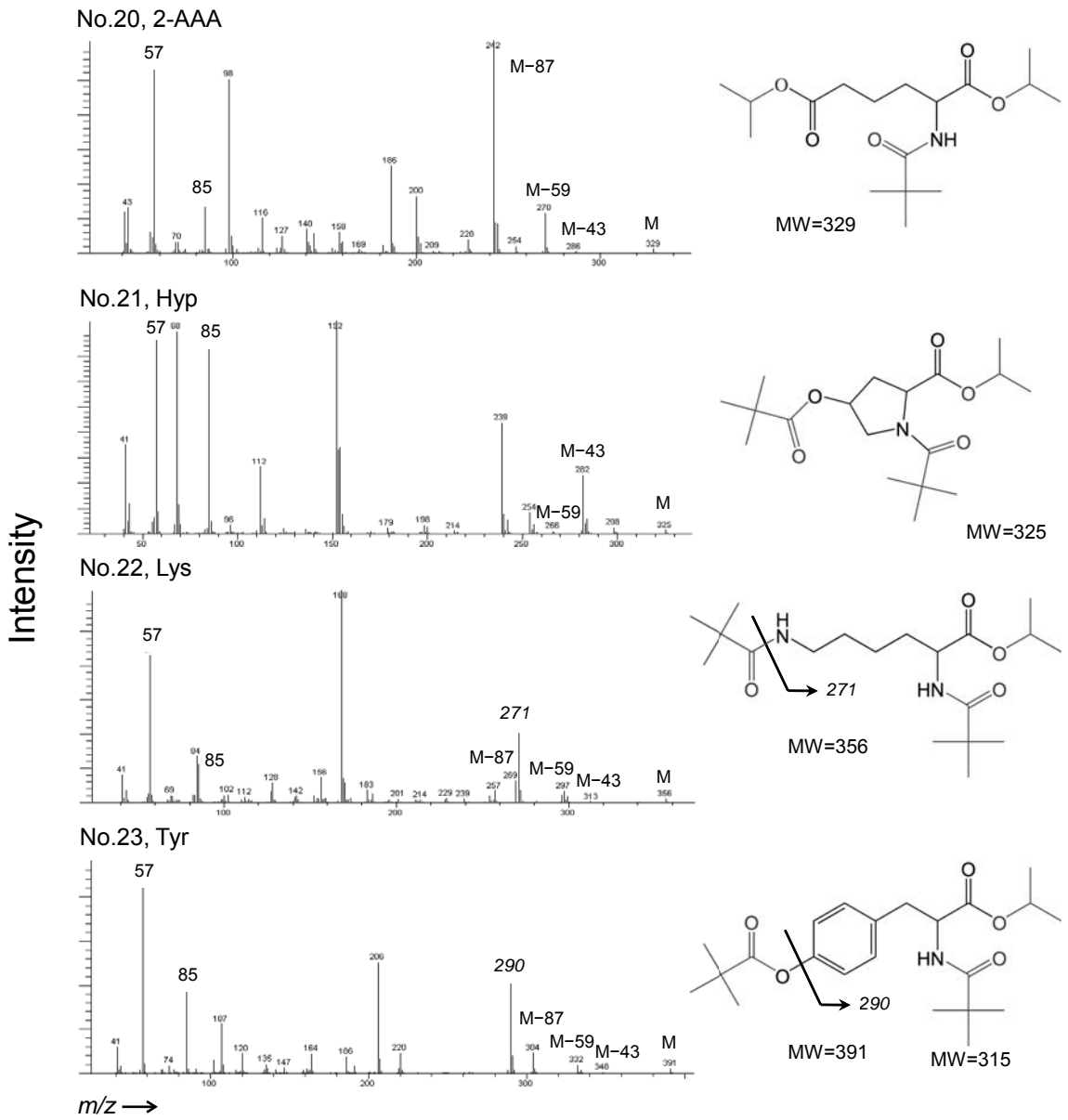


Fig. 4. (5/5)



ピバロイル基と *tert*-ブチル基に対応する m/z 85, m/z 57 を持つ (Fig. 4, No. 10)。グルタミン酸のマススペクトルは, $[M]^+$ が m/z 315 であり, $[M-43]^+$, $[M-59]^+$, $[M-87]^+$ に対応する m/z 272, m/z 256, m/z 228, ピバロイル基と *tert*-ブチル基に対応する m/z 85, m/z 57 を持つ (Fig. 4, No. 18)。フェニルアラニンのマススペクトルは, $[M]^+$ が m/z 291 であり, $[M-43]^+$, $[M-59]^+$, $[M-87]^+$ に対応する m/z 248, m/z 232, m/z 204, ピバロイル基と *tert*-ブチル基に対応する m/z 85, m/z 57 を持つ (Fig. 4, No. 19)。

また, ヒドロキシル基 (セリン: Fig. 4, No. 15) や硫黄原子 (メチオニン: Fig. 4, No. 17), 末端にアミノ基を持つアミノ酸 (β -アラニン: Fig. 4, No. 6, アミノ酪酸: Fig. 4, No. 11) などは, ピバロイル基が脱離した $[M-85]^+$ を特徴的に示す (それぞれ, m/z 230, m/z 275, m/z 130, m/z 144)。

しかし, これらのマススペクトルには, 同定が難しいイオンフラグメントも多い。例えば, セリン (Fig. 4, No. 15) の m/z 128 やメチオニン (Fig. 4, No. 17) の m/z 141, ヒドロキシプロリン (Fig. 4, No. 21) の m/z 152 などである。また, ロイシン (Fig. 4, No. 9) とイソロイシン (Fig. 4, No. 10) のように, 構造異性体のフラグメントパターンは非常に類似していることが多い。そのため, アミノ酸のピバロイル/イソプロピルエステル誘導体の同定は, 標準物質の保持時間の情報をあわせて比較する必要がある。

謝 辞

本稿で用いたカワノリは, 鈴木利明氏 (無所属)・馬場美和氏 (永楽堂) から, 人骨コラーゲンは, 米田穰准教授・内藤裕一氏 (東京大学新領域創成科学研究科) から, 下北沖の海洋堆積物は, 稲垣史生博士 (JAMSTEC 高知コアセンター) から提供されたものである。深く感謝いたします。本稿の内容は, 科学研究費 (力石・高野) により実施した研究成果の一部を取り纏めたものである。

引用文献

Aoike K. (2007) CK06-06 *D/V Chikyū* shakedown cruise offshore Shimokita. Laboratory operation

report, CDEX-JAMSTEC, pp. 1-73.

- Engel M. H., Macko S. A., and Silfer J. A. (1990) Carbon isotope composition of individual amino acids in the Murchison meteorite. *Nature* **348**, 47-49
- 力石嘉人・柏山祐一郎・小川奈々子・大河内直彦 (2007) 生態学指標としての安定同位体: アミノ酸の窒素同位体比分析による新展開 *Radioisotopes* **56**, 436-477.
- Cronin J. R. and Pizzarello S. (1997) Enantiomeric excesses in meteoric amino acids. *Science* **275**, 951-955.
- MacKenzie S. L., Tenaschuk D., and Fortier G. (1987) Analysis of amino acids by gas-liquid chromatography as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives: Preparation of derivatives in a single reaction. *J. Chromatogr. A* **387**, 241-253.
- Metges C. C., Petzke K.-J., and Hennig U. (1996) Gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometric comparison of *N*-acetyl- and *N*-pivaloyl amino acids esters to measure ^{15}N isotopic abundances in physiological samples: A pilot study on amino acids synthesis in the upper gastro-intestinal tract of minipigs. *J. Mass. Spectrom.* **31**, 367-376.
- Montigon F., Boza J. J., and Fay B. (2001) Determination of ^{13}C - and ^{15}N -enrichment of glutamine by gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry after *N* (O, S)-ethoxycarbonyl ethyl ester derivatization. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **15**, 116-123.
- Kvenvolden K. and Kaplan I. R. (1970) Evidence for extraterrestrial amino-acids and hydrocarbons in the Murchison meteorite. *Nature* **228**, 923-926.
- Pelz O., Cifuentes L. A., Hammer B.T., Kelley C. A., and Coffin R.B. (1998) Tracing the assimilation of organic compounds using $\delta^{13}\text{C}$ analysis of unique amino acids in the bacterial peptidoglycan cell wall. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**, 229-240.
- Pizzarello S. and Cronin J. R. (1998) Alanine enantiomers in the Murchison meteorite. *Nature* **394**, 236.
- Shimoyama A., Ponnampereuma C., and Yanai K. (1979) Amino acid in the Yamato carbonaceous chondrite from Antarctica. *Nature* **282**, 394-396.