

技術論文

アミノ酸 (エトキシカルボニル / エチルエステル誘導体) の GC/MS による解析 *

山口保彦^{**, ***, ****} · 力石嘉人^{****} · 横山祐典^{**, ***, ****} · 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

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: 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: 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: Pelz et al. 1998)、ピバロイル / イソプロピルエステル化 (Pv/iPr: Metges et al., 1996)、エトキシカルボニル / エチルエステル化 (EtOC/Et: Montigon et al. 2001) などが一般的である。

本報で注目するアミノ酸のエトキシカルボニル / エチルエステル誘導体化は、Husek et al. (1991) によって初めて導入され、主に食品・医療などの研究分野でアミノ酸の定性・定量分析に用いられてきた。地球惑星科学分野では例えば、隕石アミノ酸の D/L 分離の前処理などにしばしば用いられて

きた (e.g. Meierhenrich et al. 2004)。ただしアミノ酸同位体組成分析への応用例は少なく、しかもその多くが¹⁵Nや¹³Cのラベル実験の分析であり (e.g. Montigon et al. 2001; Godin et al. 2007)、同位体の天然存在度分析に用いられた研究は、我々の知る限り数例が見られるのみである (Sacks and Brenna, 2005; Pan et al. 2007)。

本誘導体化の長所としては、20 種のタンパク性アミノ酸のうち、グルタミンやアスパラギン、トリプトファンなど、他の手法では誘導体化が難しいアミノ酸を含む、19 種が誘導体化可能という点が挙げられる。例外としてアルギニンは、側鎖のイミノ基に対して反応が進まず、誘導体化ができない。また、本誘導体化のもう一つの大きな長所として、処理の簡便さが挙げられる。他の誘導体化法では、複数段階反応や加熱を必要としたり、水の存在下では反応が進まないなど、処理や準備に手間がかかることが多い。一方で本誘導体化は、常温・水層における 1 段階反応である上、反応そのものは 5 分ほどで完了する。以上に述べた長所

* GC/MS analysis of amino acids as ethoxycarbonyl ethyl ester

** 東京大学 海洋研究所 〒164-8639 東京都中野区南台 1-15-1

Yasuhiko T. Yamaguchi and Yusuke Yokoyama: Ocean Research Institute, The University of Tokyo 1-15-1 Minamidai, Nakano-ku, Tokyo 164-8639 Japan

*** 東京大学 大学院理学系研究科 地球惑星科学専攻 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Yasuhiko T. Yamaguchi, Yusuke Yokoyama and Naohiko Ohkouchi: Department of Earth and Planetary Science, The University of Tokyo 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033 Japan

**** 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

Yasuhiko T. Yamaguchi, Yoshito Chikaraishi, Yusuke Yokoyama and Naohiko Ohkouchi: Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology 2-15 Natsushima-Cho, Yokosuka 237-0061 Japan

***** 東京工業大学 大学院総合理工学研究科 化学環境学専攻 〒226-8502 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259

Naohiko Ohkouchi: Department of Environmental Chemical Engineering, Tokyo Institute of Technology 4259 Nagatsuda, Midori-ku, Yokohama 226-8502, Japan

e-mail: y-t-yamaguchi@ori.u-tokyo.ac.jp

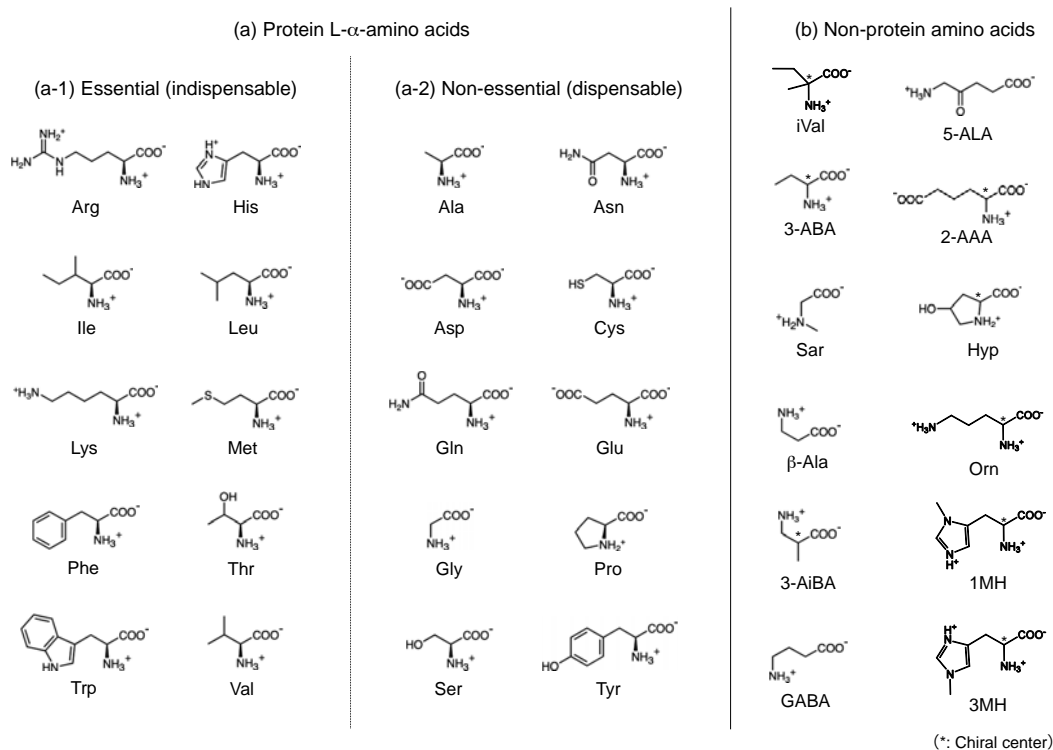


Fig. 1. Chemical structures of amino acids: (a-1) essential and (a-2) non-essential protein L- α -amino acids, and (b) typical non-protein amino acids. Abbreviations refer in Table 1.

から、アミノ酸のエトキシカルボニル/エチルエステル誘導体化は今後、有機地球化学を含む様々な地球惑星科学分野の研究（特にアミノ酸の窒素同位体組成分析）で応用が広がっていくことが期待される。

本報では、その誘導体化法と GC/MS 分析法（同定法）を紹介する。GC/MS による同定法の先行研究としては、25 種類のアミノ酸誘導体化体について報告した Huang et al. (1993) が挙げられるが、本報では新たに 10 種類の非タンパク性アミノ酸 (Table1 の No.1, 4, 5, 6, 7, 13, 20, 23, 26, 27) を加えた同定法を報告する。

2. 試料

代表試料として、「ハイパードルフィン」調査潜航 (NT08-10, Dive#846) において相模湾初島沖の冷湧水域から採取されたシロウリガイ (*Calypotogena sp.*)、青森県で栽培されたダイコン (*Raphanus sativus*)、瀬戸内海で採取された魚 (イカナゴ, *Ammodytes personatus*) 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

アミノ酸の抽出とエトキシカルボニル/エチルエステル誘導体化の分析手順を Fig. 2 に示す。通常、試料に含まれるタンパク質に含まれるタンパク質を分析したい場合にはまず、12 規定 (mol/l) 塩酸によって酸加水分解 (100℃, 12-24 時間) することが多い。ただし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てしまうので、本報の代表試料では加水分解は行わず、試料に含まれる遊離体アミノ酸を直接、誘導体化した。まず試料 (シロウリガイ, ダイコン, イカナゴ) に含まれる組織液を 1 ml 抽出し、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。次に、水: エタノール: ピリジン: エチルクロロフォルメイトが体積比で 20:10:2.5:1 になるように、試料水溶液 1 ml に対しエタノール 500 μ l とピリジン 125 μ l を加えて軽く振り混ぜた後、エチルクロロ

Table 1. Summary of retention time and prominent fragment ions for ethoxycarbonyl-amino acid-ethyl esters

No.	Compound	Abbreviation	formula	Molecular weight		Retention time (min)	Prominent fragment ions (m/z)			Level of identification**
				undervative	derivative		Base	Others		
1	Sarcosine* (2-amino-N-methylethanoic acid)	Sar	C ₈ H ₁₅ NO ₄	89	189	18.7	116	88, 70, 44	-	
2	Alanine	Ala	C ₈ H ₁₅ NO ₄	89	189	19.0	116	189, 88, 72, 44	4	
3	Glycine	Gly	C ₇ H ₁₃ NO ₄	75	175	19.2	102		4	
4	Isovaline*	iVal	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	117	217	20.5	144	188, 116, 98, 72	-	
5	3-Aminoisobutyric acid* (2-amino-2-methylbutanoic acid)	3-AiBA	C ₉ H ₁₇ NO ₄	103	203	20.8	130	102, 84, 58	4	
6	β-Alanine* (3-amino-2-methylpropanoic acid)	β-Ala	C ₈ H ₁₅ NO ₄	89	189	21.2	115	189, 144, 116, 102, 98	4	
7	2-Aminobutyric acid* (3-aminopropanoic acid)	2-ABA	C ₉ H ₁₇ NO ₄	103	203	21.7	102	158, 130, 129, 112, 84	-	
8	Valine	Val	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	117	217	21.9	144	116, 72	4	
9	pyro-Glutamic acid	p-Glu	C ₇ H ₁₁ NO ₃	129	157	23.2	84	157	4	
10	Leucine	Leu	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	131	231	23.8	158	102, 86	4	
11	Serine	Ser	C ₈ H ₁₅ NO ₅	105	205	24.1	132	175, 129, 101, 86	4	
12	Isoleucine	Ile	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	131	231	24.1	158	102, 86	4	
13	4-aminobutyric acid* (4-aminopentanoic acid)	GABA	C ₉ H ₁₇ NO ₄	103	203	24.2	116	158, 130, 112, 102, 86	-	
14	Threonine	Thr	C ₉ H ₁₇ NO ₅	119	219	24.2	129	175, 146, 101, 74	4	
15	Proline	Pro	C ₁₀ H ₁₇ NO ₄	115	215	24.6	142	98, 70	4	
16	Asparagine	Asn	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₄	132	214	25.1	141	174, 102, 69	4	
17	Aspartic acid	Asp	C ₁₁ H ₁₉ NO ₆	133	261	28.1	188	142, 116, 74, 70	4	
18	Hydroxyproline* (4-hydroxypyrrolidine-2-carboxylic acid)	Hyp	C ₁₀ H ₁₇ NO ₅	131	231	29.2	158	86, 68	4	
19	Methionine	Met	C ₁₀ H ₁₉ NO ₂ S	149	249	29.6	175	188, 176, 142, 129, 101, 61	4	
20	δ-Aminolevulinic acid* (5-amino-4-oxo-pentanoic acid)	5-ALA	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	131	231	29.6	129	186, 158, 140, 101	-	
21	Glutamic acid	Glu	C ₁₂ H ₂₅ NO ₆	147	275	30.7	202	156, 128, 84	4	
22	Phenylalanine	Phe	C ₁₄ H ₁₉ NO ₄	165	265	32.0	176	192, 131, 120, 102, 91, 74	4	
23	2-Aminoadipic acid* (2-amino-hexanedioic acid)	2-AAA	C ₁₃ H ₂₃ NO ₆	189	289	32.9	216	170, 128, 124, 98	-	
24	Cysteine	Cys	C ₁₁ H ₁₉ NO ₆ S	121	293	33.0	220	174, 148, 114, 102, 74	-	
25	Glutamine	Gln	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₅	146	246	34.1	84	173, 128	4	
26	3-Methylhistidine* (2-amino-3-(β-methylimidazol-4-yl)propanoic acid)	3MH	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	169	269	36.3	95	196, 180, 96	-	
27	1-Methylhistidine* (2-amino-3-(1-methylimidazol-4-yl)propanoic acid)	1MH	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	169	269	36.6	95	196, 180, 150, 96	-	
28	Ornithine* (2,5-diaminopentanoic acid)	Orn	C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O ₆	132	304	36.9	142	258, 212, 70	-	
29	Lysine	Lys	C ₁₄ H ₂₆ N ₂ O ₆	146	318	38.8	156	272, 226, 84	4	
30	Histidine	His	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₆	155	327	39.8	238	327, 282, 254, 154, 81	4	
31	Tyrosine	Tyr	C ₁₇ H ₂₃ NO ₇	181	353	41.7	107	280, 264, 192	4	
32	Tryptophane	Trp	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₄	204	304	43.8	130	304, 231, 215	4	

Peak numbers refer to chromatogram in Fig.2 (Sar, iVal, 2-ABA, GABA, 5-ALA, 2-AAA, Cys, 3MH, 1MH and Orn 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.

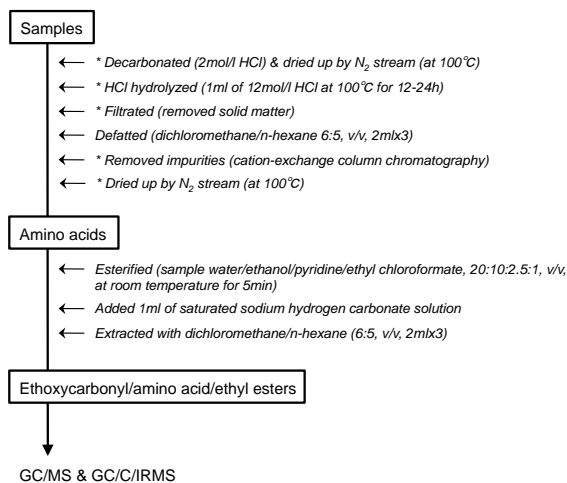


Fig. 2. Extraction and derivatization procedures of amino acids. Asterisks indicates optional processes.

フォルメイト 50 μ l を加えた。バイアルの栓を固く締めて 10 秒ほどよく振り、常温で 5 分静置した。その後、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液を 1 ml 加えた。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、アミノ酸のエトキシカルボニル / エチルエステル誘導体化体を得た。

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°C で 0.2 分間保持し、350°C まで 600°C / 分で昇温した後、350°C で 10 分間保持した。分析カラムは、J&W HP-5MS (30 m 長、0.25 mm 径、0.15 μ m 膜厚) を使用し、40°C で 4 分間保持し、90°C まで 10°C / 分で昇温し、90°C から 220°C まで 5°C / 分で昇温した後、220°C で 10 分間保持した。キャリアーガスの流速は、1.4 ml/

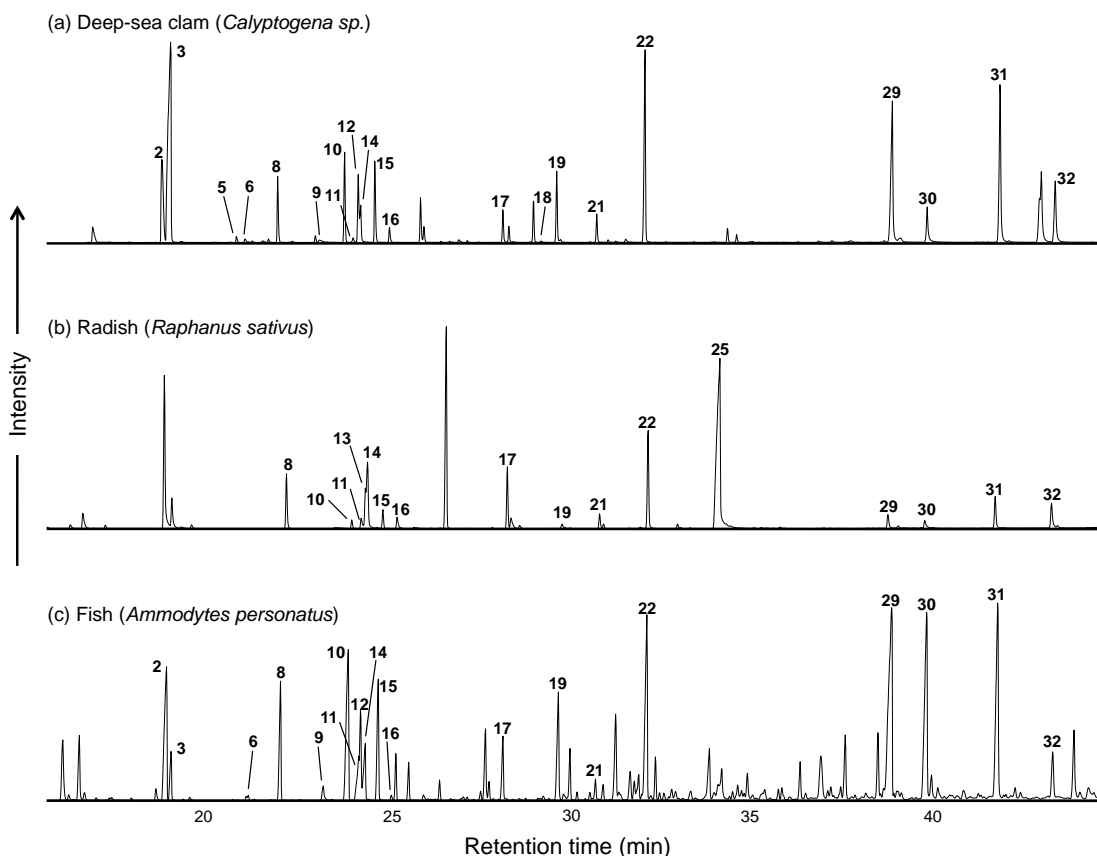


Fig. 3. TIC chromatograms of amino acids from (a) deep-sea clam, (b) radish, and (c) fish. Peak numbers correspond to the compound numbers in Table 1 and Fig.4.

分の定流速 (constant flow) モードで使用した。

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 に、同定レベルを示す。アミノ酸のエトキシカルボニル/エチルエステル誘導体化体の基本的なマススペクトルは、エチルエステル基が脱離した $[M-45]^+$ 、エトキシカルボニル基が脱離した $[M-73]^+$ 、エトキシカルボニル基二つが脱離して H^+ がアミノ基に付加した $[M-145]^+$ などに対応したイオンフラグメントを示す。各アミノ酸に特有な開裂も多いので、代表的なものを、以下に簡単に紹介するほか、Fig. 4 では構造式に開裂パターンを示した。詳しい開裂のスキームは、Huang et al. (1993) を参照されたい。

側鎖が C_2 以上の脂肪族アミノ酸である、2-アミノ酪酸 (Fig. 4, No. 7)、バリン (Fig. 4, No. 8)、ロイシン (Fig. 4, No. 10)、イソロイシン (Fig. 4, No. 12) は、側鎖と α 位炭素の結合が開裂して、 $m/z174$ のイオンフラグメントを示す。さらに、エチルエステル基やカルボニル基が脱離した、それぞれ $m/z129$ 、 $m/z102$ のイオンフラグメントも示す。イソバリン (Fig. 4, No. 4) は、 α 位炭素に水素ではなくメチル基が結合しているため、 $m/z188$ を示す。

ヒドロキシル基を持つセリン (Fig. 4, No. 11) とトレオニン (Fig. 4, No. 14) は、 $m/z175$ 、 $m/z129$ 、 $m/z101$ を特徴的に示す。 $m/z175$ は、McLafferty-type 転位 (水素が転位する特殊な McLafferty 転位; Huang et al. 1993) によってヒドロキシル基の水素がカルボニル基の酸素に転位して生じ、続いて C_2H_5OH が脱離して五員環構造をとると $m/z129$ に、さらに C_2H_4 が脱離すると $m/z101$ となる。また、プロリンにヒドロキシル基が置換した構造のヒドロキシプロリン (Fig. 4, No. 18) では、 $[M-145]^+$ で生じた $m/z86$ から、さらにヒドロキシル基が脱水して $m/z68$ を特徴的に示す。

アミド基を持つアスパラギン (Fig. 4, No. 16) とグルタミン (Fig. 4, No. 25) では、アミド基は誘導体化されない。特にアスパラギンでは、誘導体化の際にアミド基が脱水してシアノ基となるため、親イオンは $m/z214$ となる。グルタミンではアミド基はそのまま、 $[M-73]^+$ が五員環構造をとった後に $NH_2COOC_2H_5$ が脱離した $m/z84$ が大きな

ピークとして見られる。

酸性アミノ酸であるアスパラギン酸 (Fig. 4, No. 17)、グルタミン酸 (Fig. 4, No. 21)、2-アミノアジピン酸 (Fig. 4, No. 23) では、 $[M-73]^+$ が基本のイオンフラグメントとなる。グルタミン酸ではさらに、 $[M-73]^+$ から C_2H_5OH が脱離して五員環構造をとった $m/z156$ と、さらに $-73 + H^+$ で生じる $m/z84$ が安定であるため、大きなピークとして見られる。2-アミノアジピン酸も同様の機構で、 $m/z170$ 、 $m/z98$ を示す。なおグルタミン酸は、誘導体化の際にカルボキシル基とアミノ基の分子内縮合により、ピログルタミン酸 (Fig. 4, No. 9) を生成する。誘導体化の条件が酸性であるほど、ピログルタミン酸がより多く生じる (Husek et al. 1991)。

メチオニン (Fig. 4, No. 19) とシステイン (Fig. 4, No. 20) は、硫黄原子の影響を受けた開裂を示す。メチオニンは、硫黄原子で活性化された側鎖末端の水素がカルボキシル基に移行して (McLafferty 転位)、トレオニンやセリンと同様に $m/z175$ 、 $m/z129$ 、 $m/z101$ を示す。また、スルフォニウムイオン ($CH_3SCH_2^+$) の脱離によって、 $m/z61$ 、 $m/z188$ も示す。システインでは、バリンなどと同様に $m/z174$ を示すほか、McLafferty 転位によって $NH_2COOC_2H_5$ が脱離して $m/z204$ を示す。

芳香族アミノ酸である、フェニルアラニン (Fig. 4, No. 22)、3-メチルヒスチジン (Fig. 4, No. 26)、1-メチルヒスチジン (Fig. 4, No. 27)、ヒスチジン (Fig. 4, No. 30)、チロシン (Fig. 4, No. 31)、トリプトファン (Fig. 4, No. 32) では、側鎖の脱離と、McLafferty 転位による $NH_2COOC_2H_5$ の脱離が起きやすい。また、トリプトファンでは、特異的に親イオン $m/z304$ が大きなピークとして見られる。

塩基性アミノ酸である、オルニチン (Fig. 4, No. 28) とリシン (Fig. 4, No. 29) は、分子内求核置換反応機構によって、 $[M-73]^+$ から $NH_2COOC_2H_5$ が脱離して安定な環構造をとることで、それぞれ $m/z142$ 、 $m/z156$ を大きなピークとして示す。また、親イオンから C_2H_5OH が脱離して環構造をとることで、それぞれ $m/z258$ 、 $m/z272$ を示す。

しかしこれらのアミノ酸は、ロイシン (Fig. 4, No. 10) とイソロイシン (Fig. 4, No. 12) のように、構造異性体であることが多く、そ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。アミ

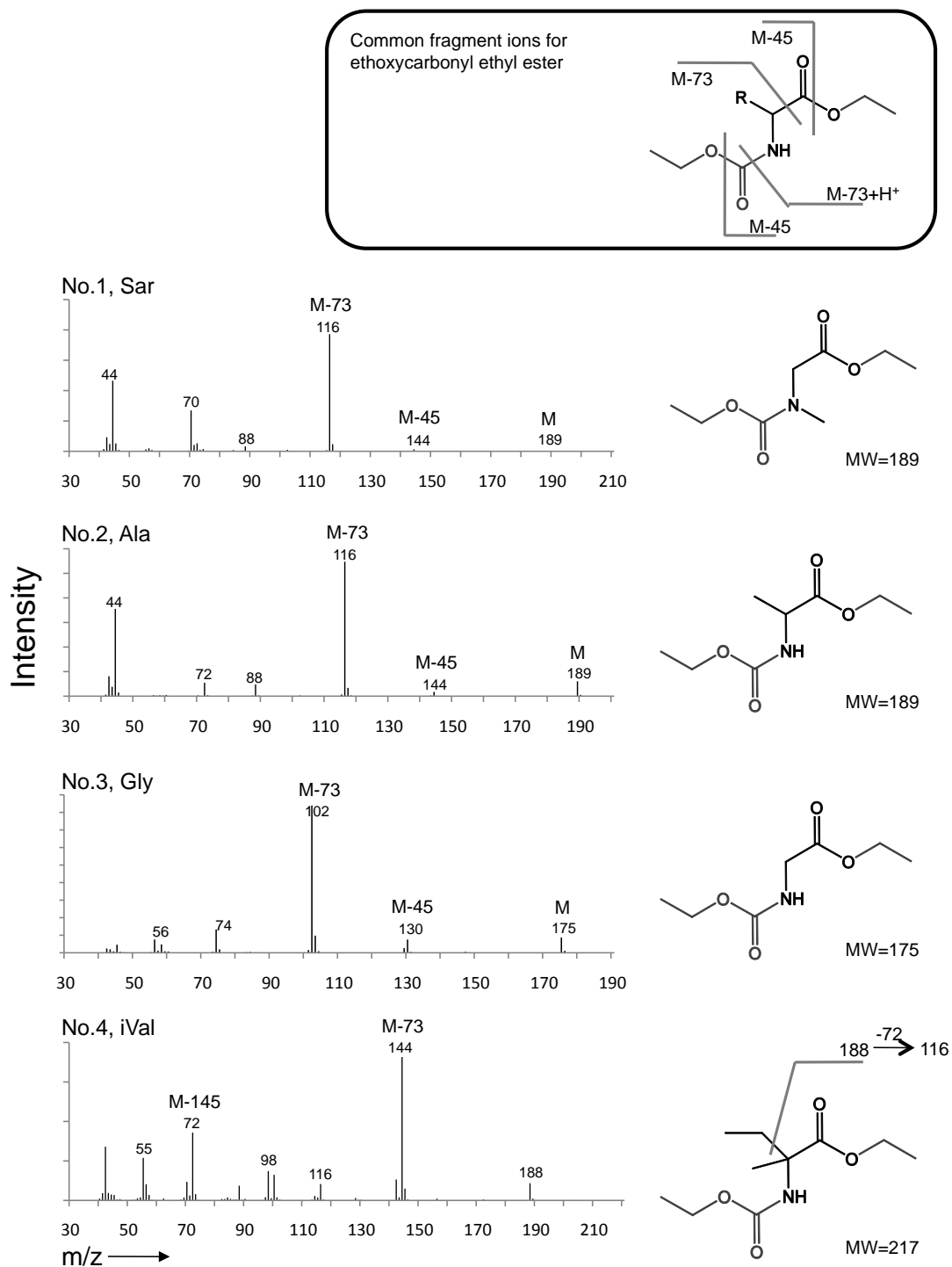
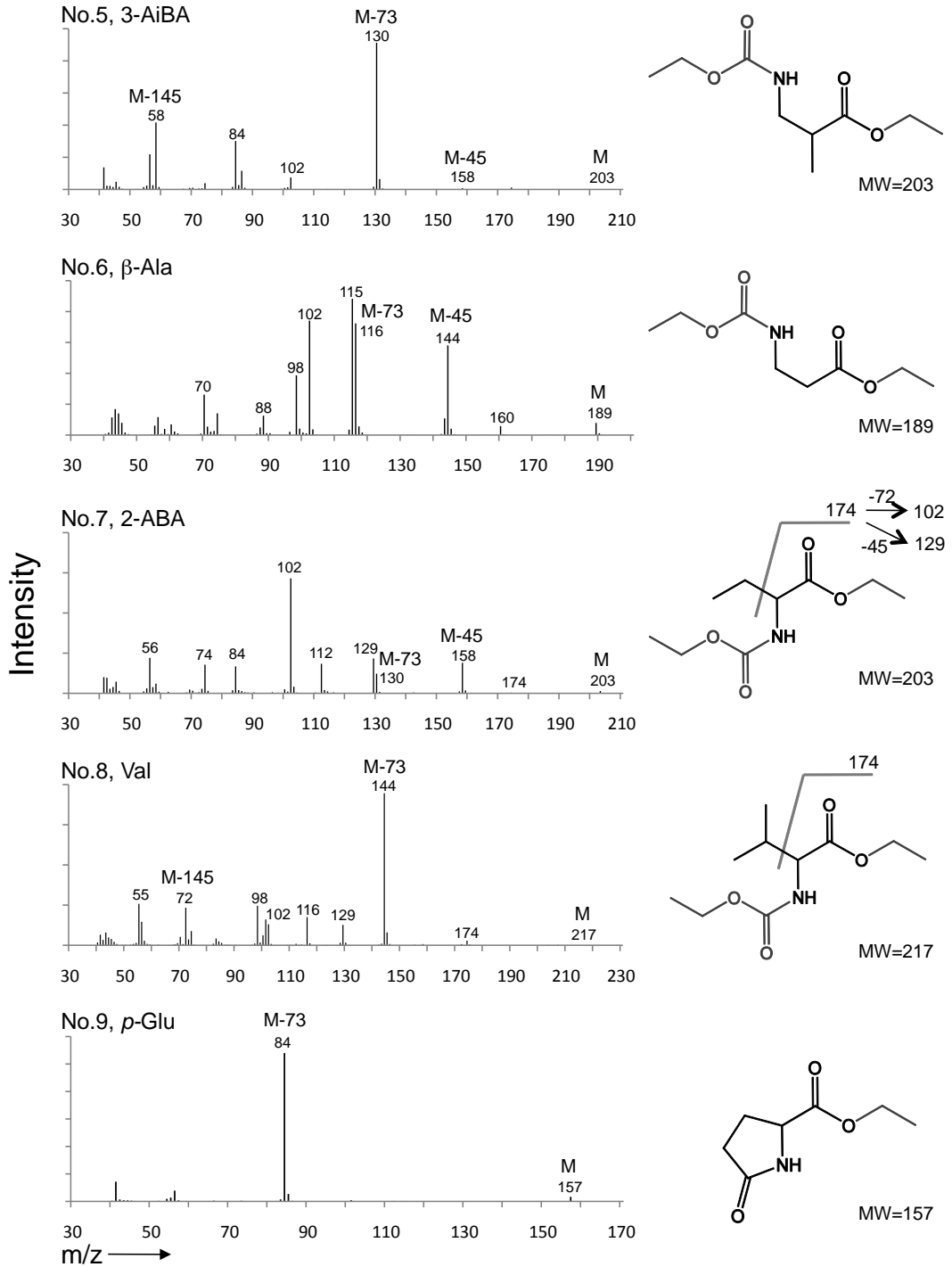
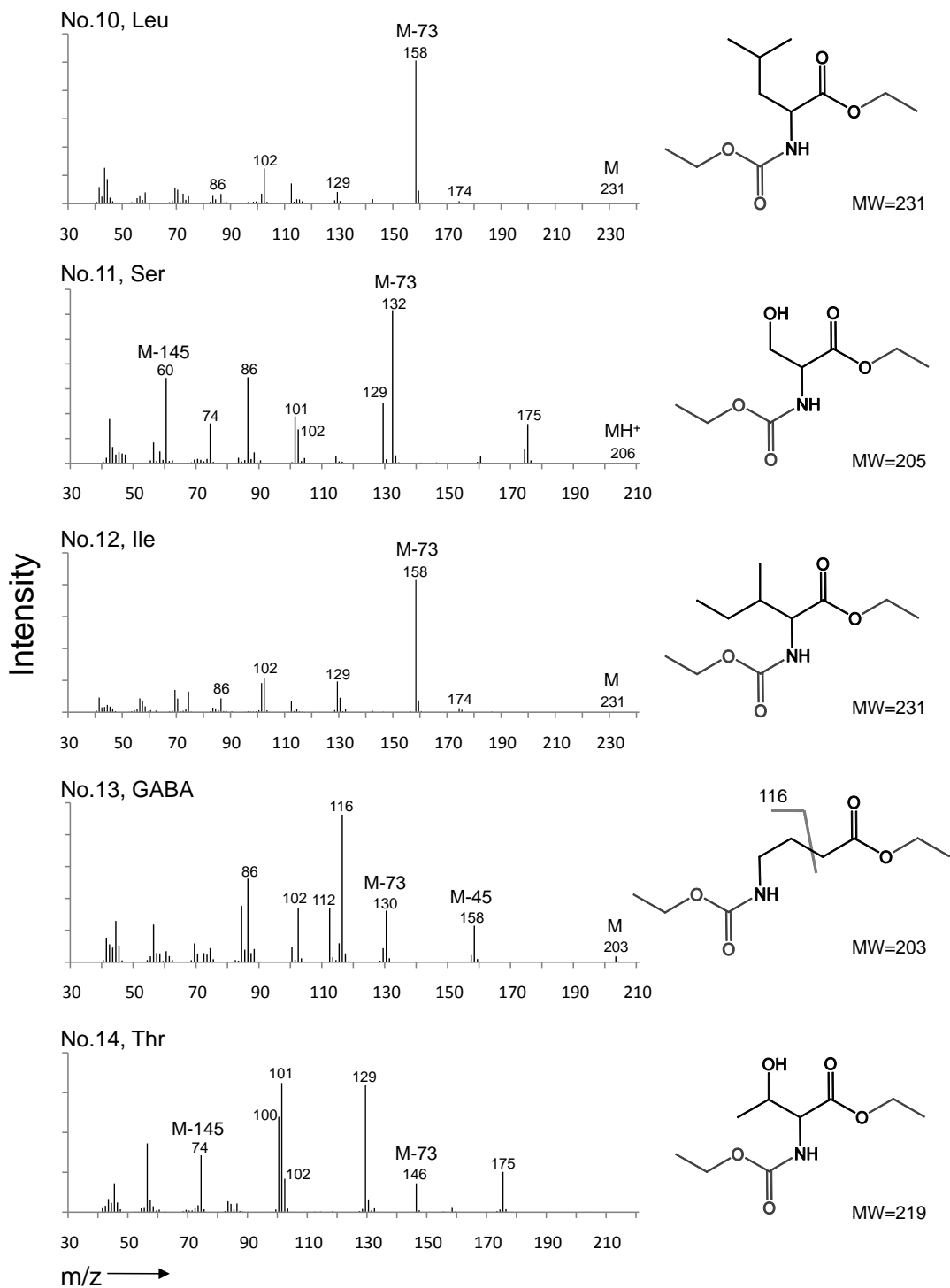
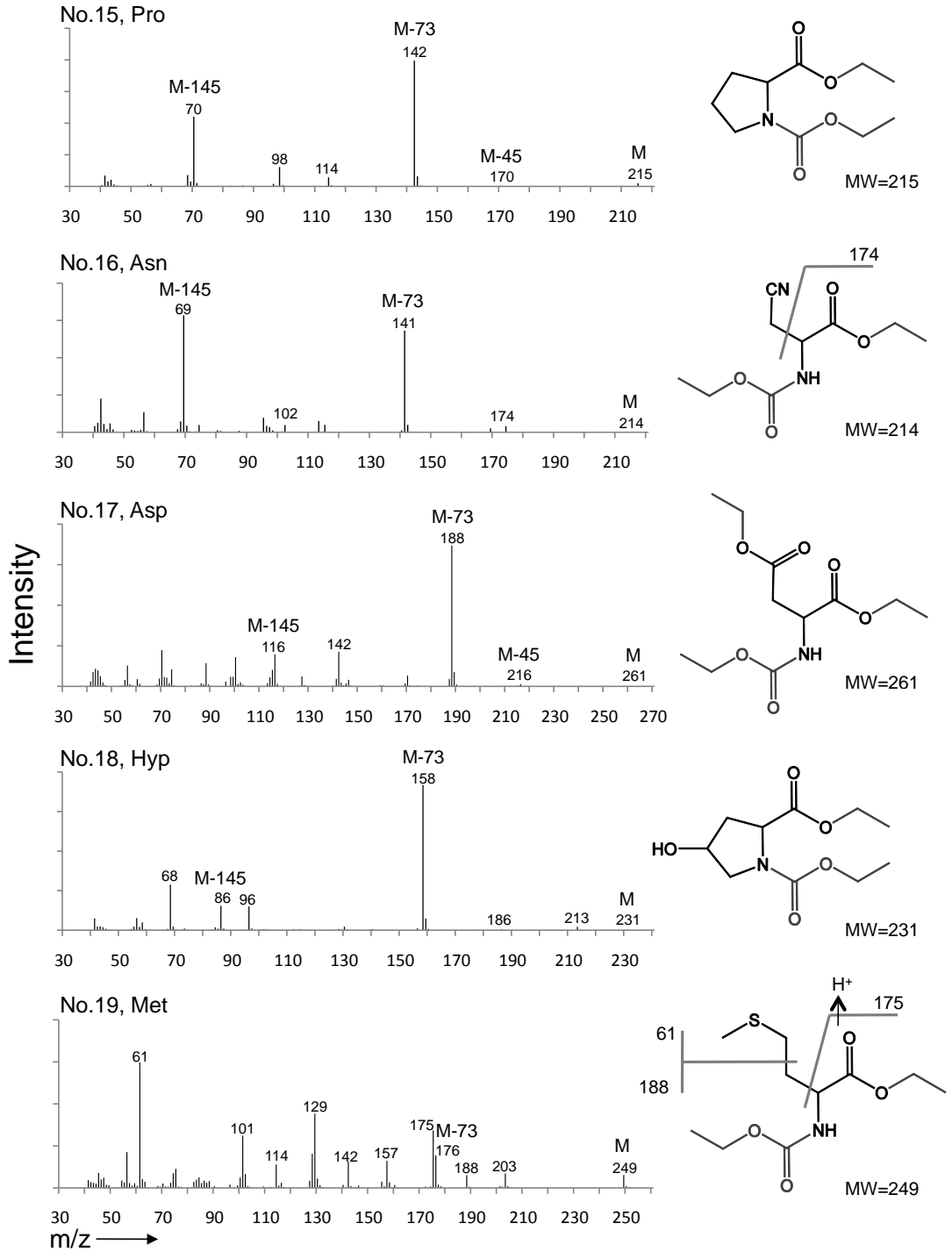
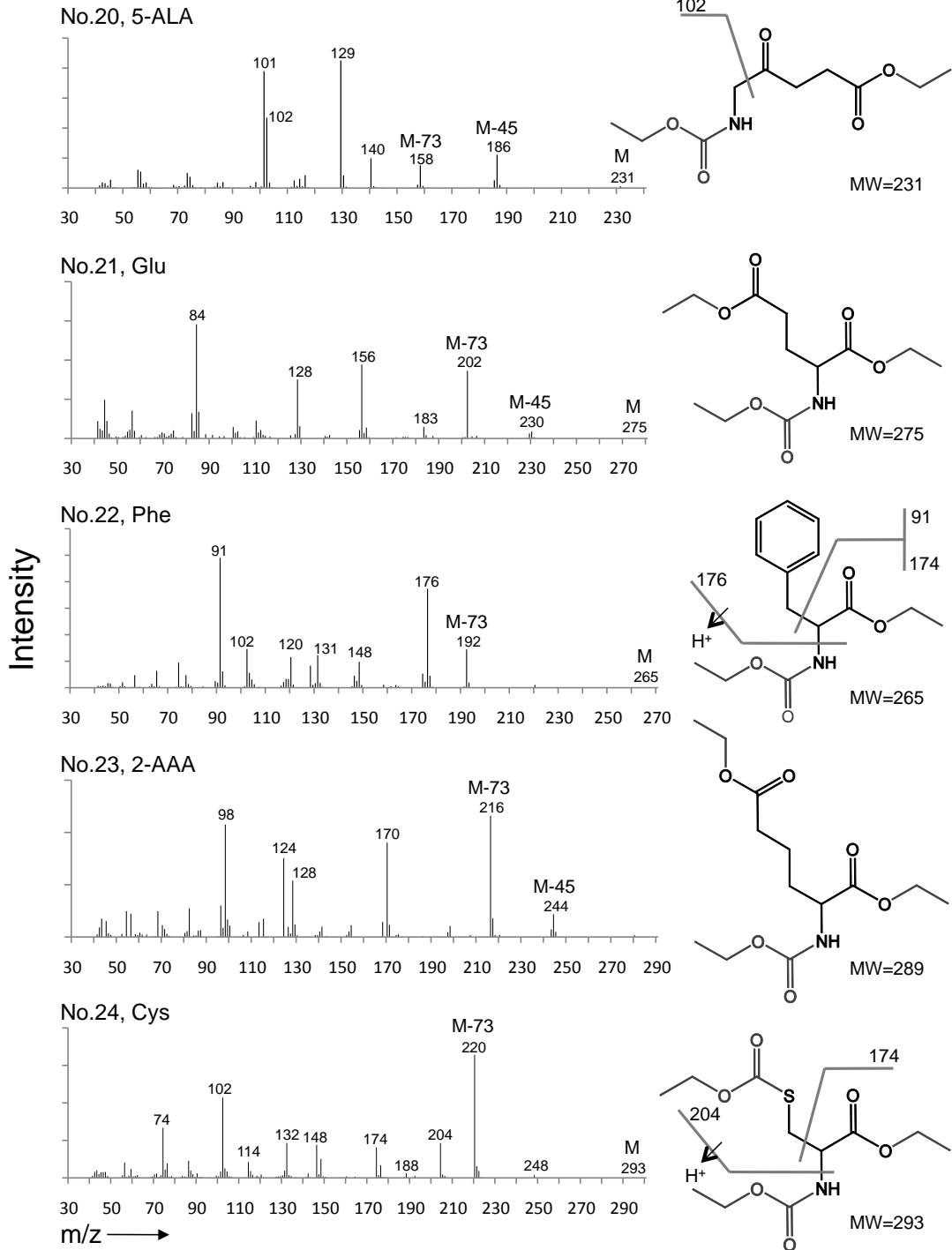


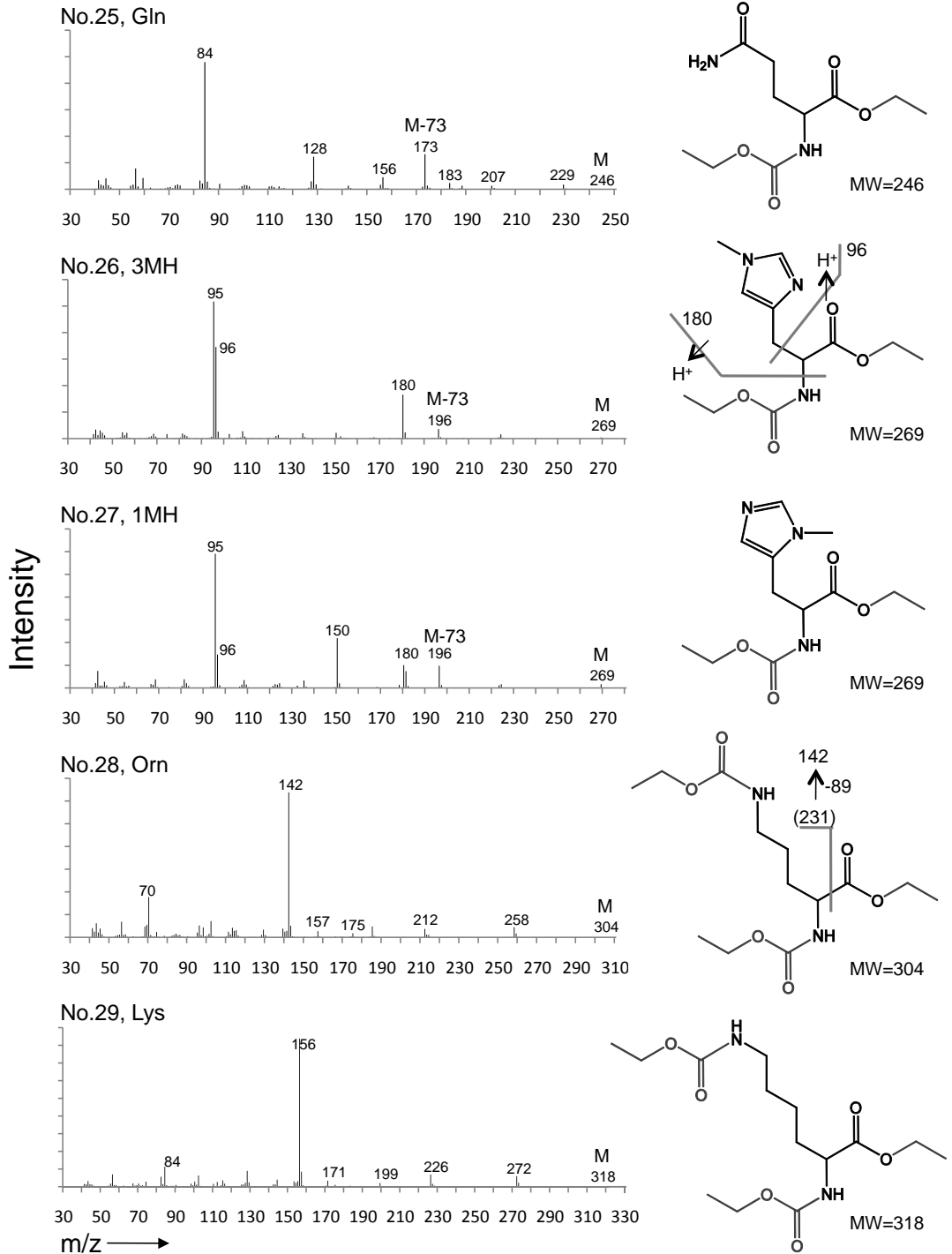
Fig. 4. Mass spectra of amino acids as ethoxycarbonyl ethyl ester derivatives. Compound numbers correspond to the compound numbers in Table 1 and the peak numbers in Fig. 3.



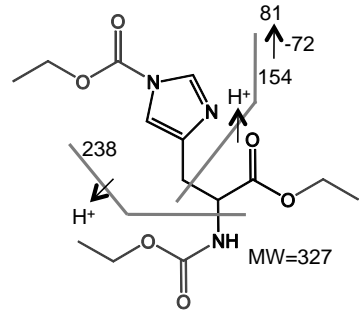
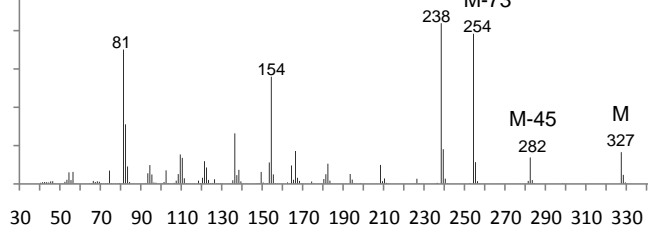






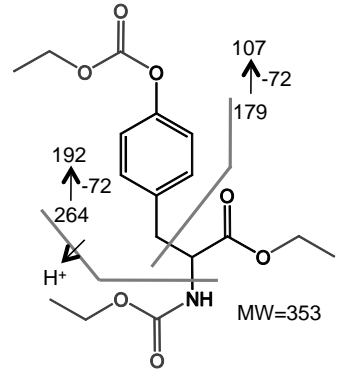
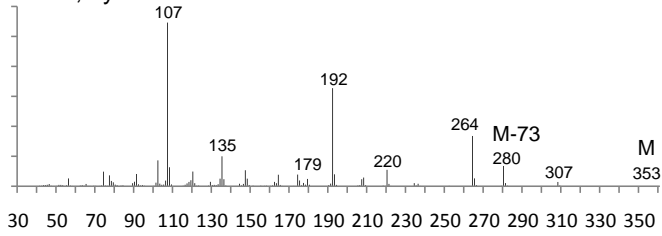


No.30, His

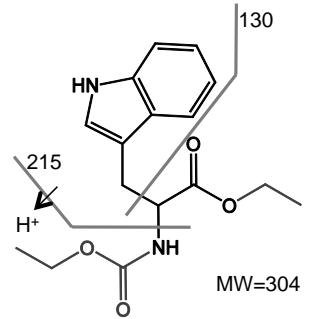
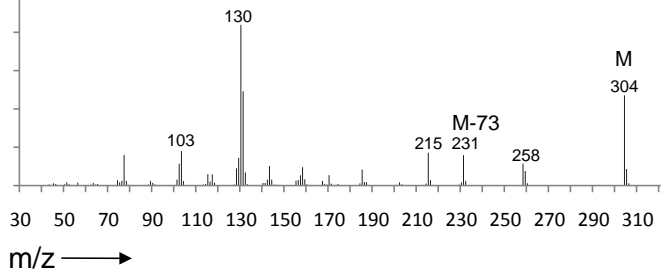


No.31, Tyr

Intensity



No.32, Trp



ノ酸のエトキシカルボニル/エチルエステル誘導体化体の同定は、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

本稿で用いたイカナゴは、奄美栽培漁業センターから提供され、シロウリガイは、小栗一将博士(海洋研究開発機構)から提供されたものである。また、小川奈々子博士、高野淑識博士、柏山祐一郎博士(海洋研究開発機構)には、アミノ酸の分析に関して議論していただいた。深く感謝いたします。本稿の内容は、科学研究費補助金(力石・横山)および環境省地球環境研究総合推進費(横山)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

- Engel M. H., Macko S. A., Silfer J. A. (1990) Carbon isotope composition of individual amino acids in the Murchison meteorite. *Nature* **348**, 47-49.
- Godin J. P., Faure M., Breuille D., Hopfgartner G., Fay L. B. (2007) Determination of ^{13}C isotopic enrichment of valine and threonine by GC-C-IRMS after formation of the N(O,S)-ethoxycarbonyl ethyl ester derivatives of the amino acids, *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 909-918.
- Huang Z. H., Wang J., Gage D. A., Watson J. T., Sweeley C. C. (1993) Characterization of N-ethoxycarbonyl ethyl esters of amino acids by mass spectrometry, *J. Chromatogr.* **635**, 271-281.
- Husek P. (1991) Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids. *J. Chromatogr.* **552**, 289-299.
- MacKenzie S. L., Tenaschuk D., 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.
- Meierhenrich U. J., G. M. Muñoz Caro, J. H. Bredehöft, E. K. Jessberger, W. H. -P. Thiemann (2004) Identification of diamino acids in the Murchison meteorite, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, **25**, 9182-9186.
- Metges C. C., Petzke K. -J., 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., 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 derivatisation. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **15**, 116-123.
- Pan B. S., Wolyniak C. J., Brenna J. T. (2007) The intramolecular $\delta^{15}\text{N}$ of lysine responds to respiratory status in *Paracoccus denitrificans*, *Amino Acids* **33**, 631-638.
- Pelz O., Cifuentes L. A., Hammer B. T., Kelley C. A., 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.
- Sacks G. L., Brenna J. T. (2005) N-15/N-14 position-specific isotopic analyses of polynitrogenous amino acids. *Anal. Chem.* **77**, 1013-1019.