技術論文

イオンペアクロマトグラフィー/電子スプレーイオン化質量分析法 (LC/ESI-MS) による短鎖ペプチド類のマススペクトル解析*

高野 淑識**.ª, 大場 康弘***, 大河内 直彦**

(2021年3月9日受付, 2021年6月24日受理)

Abstract

We report a mass spectra database of underivatized short-chain peptides by using ion-pair liquid chromatography with electrospray ionization-mass spectrometry (LC/ESI-MS). The ion-pairing chromatographic separation by a porous graphitic carbon stationary column with nonafluoropentanoic acid solution and acetonitrile solvent gradient revealed a positive correlation between the retention time and the degree of molecular hydrophobicity. The addition of a proton donor of 0.1% formic acid for the inverse gradient program induces an efficient stabilized ionization on the ESI positive mode. We compiled the summary of retention time and those of some typical mass fragmentation patterns on underivatized short-chain peptides and related-molecule groups. The present method will be applied to other multi-dimensional chromatographies for further detailed description of short-chain peptide chemistry.

1. はじめに

天然界におけるアミノ酸の中央代謝系としての 役割やその栄養学的知見が重要視されるように なって、すでに約100年以上が経過した(e.g, Osborne et al., 1914;吉田, 1984)。池田菊苗によ るグルタミン酸ナトリウムの特許は, 1908年であ る(池田, 1908)。その後の産業界では、メチオ ニンやリシンをはじめ、必須アミノ酸の社会的需 要に苦心された様子が伺える(e.g.,赤堀・泉, 1956;太田, 1974)。その間,いくつかの先駆的 研究が契機となり、アミノ酸とタンパク質の間に ある準安定物質として、短鎖ペプチド類の重要性 が理解されるようになった(e.g., Pittman et al., 1967; Hare, 1969; Matthews and Adibi, 1976; Silk et al., 1985; Gilbert et al., 2008)。短鎖ペプチド類 の分析法は,分子自身のデリケートな性質(易分 解性)に加えて,試料由来の有機・無機マトリッ クス効果の除去,分子種の多様性など(例えば, タンパク性L-アミノ酸20種の二量体の組合せだ けで400種存在),分析上のハードルが若干あった のだろう。それゆえに,アミノ酸に比べて,詳細 な動態や知見が遅れ気味であったという側面があ る(Takano et al., 2021)。

アミノ酸と同様に、短鎖ペプチド分子内の電子密度は、その局在性が大きい。分子内に双性イオンの 挙動を有する極性官能基が複数あり、かつ、分子間 のペプチド結合を介在するためである。例として、 アラニルバリン(Alanylvaline: C₈H₁₆N₂O₃, Exact Mass 188.12)の基底状態における電子密度分布を Figure 1 に示した。アミノ基の窒素周辺やカルボ キシル基の酸素周辺ならびにペプチド結合付近に

***北海道大学 低温科学研究所 〒060-0819 札幌市北区北19条西 8 丁目 Yasuhiro Oba: Institute of Low Temperature Science (ILTS), Hokkaido University, N19W8, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0819, Japan

Corresponding Author: E-mail: takano@jamstec.go.jp, Fax: +81-46-867-9025

^{*}LC/ESI-MS analysis of underivatized short-chain peptides and mass spectrum

^{**}国立研究開発法人 海洋研究開発機構 生物地球化学研究センター 〒237-0061 横須賀市夏島町 2-15 Yoshinori Takano, Naohiko Ohkouchi: Biogeochemistry Research Center (BGC), Japan Agency for Marine-Earth Science & Technology (JAMSTEC), Natsushima, Yokosuka 237-0061, Japan



Figure 1 (a) Molecular structure of alanylvaline within the electron cloud and (b) the electrostatic potential in the ground state. The Javascript was used with GLmol & WebGL viewer.

電子の局在が観察できる。ゆえに、この分子内電 位を上手にコントロールすることが、アミノ酸同様、 前処理の湿式操作を含めた一連の分析フローの鍵 となる。また、ターゲット基質に適切なイオンペ アを形成すれば、分離度の良いクロマトグラフィー を最適化できる (e.g., Cecchi, 2008; Takano et al., 2015; Ristroph and Prud'homme, 2019; 高野ら, 2015 の解説を参照)。さらに、短鎖ペプチドの基本構 成は、アミノ酸であるので、その疎水性インデッ クス(例えば, Kyte and Doolittle, 1982)は、クロ マトグラフィーの傾向を読む上で参考になる (Takano et al., 2021)。短鎖ペプチド類の分離に関 して、クロマトグラフィーとキャピラリー電気泳 動法(Capillary Electrophoresis)と組み合わせた クロスバリデーションを行う包括的分析法の報告 もある (e.g., Ozawa et al., 2020)。

誘導体化を行わない分析法(Underivatized method)では、任意のターゲット分子のベースライン分離の後に、別次元の二次分析を展開できるというメリットがある(e.g., Takano et al., 2015; Ishikawa et al., 2018ab; Sun et al., 2020)。また、誘導体化プロセスを行わないことで分析誤差を減少させるメリットもある。ファイナルフラクション 精製までの湿式操作を含め、クロマトグラフィー による短鎖ペプチドの分離が最適化されたことに より、今後、高精度な一次分析および精密な二次 分析が可能になったといえる。ここでは、地球・ 環境有機分子質量分析法の一環として、誘導体化 を行わない短鎖ペプチド類(Underivatized shortchain peptides)のLC/ESI-MSによるマススペクト ルライブラリーをまとめた。

2. 分析方法

2.1. 化学的なペプチドの定義

アミノ酸分子(R₁-)と同分子(R₂-)の間で一 方のアミノ基と他方のカルボキシル基が,脱水縮 合した化学結合をペプチド結合と呼ぶ(R₁-, R₂-: アミノ酸)。それが二量体分子である場合,ジペ プチドと呼び,以降,三量体をトリペプチド,複 数体をオリゴペプチド,多量体をポリペプチド,複 数体をオリゴペプチド,多量体をポリペプチドと 称する。単にアミンが脱水縮合した結合は,ペプ チド結合ではなく,アミド結合と定義される。本 稿では,基本的かつ典型的なマススペクトルから 見えてくる法則性を把握するために,主にL-ア ミノ酸から構成される代表的な短鎖ペプチド類(グ リシン,アラニン,アスパラギン酸,グルタミン 酸,セリン,バリン残基など)を中心に扱うこと とする。また,同組成・同質量数のLL-,LD-, DL-,DD-のような立体異性の挙動(e.g.,分子モ デル計算:Munegumi, 2010)は,別稿で扱う (Appendix-I)。

2.2. 短鎖ペプチド類の試薬

短鎖ペプチド および関連物質は、国内外の試薬メー $\pi - (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, PH)$ Japan Co., Ltd., Sigma-Aldrich Co. LLC, Funakoshi Co., Ltd.)から入手した標品を用いた。ここでは、タンパク 性L-アミノ酸および非タンパク性アミノ酸から構成さ れる短鎖ペプチドおよび無水物について示した。タン パク性L-アミノ酸から構成されるペプチドは、 Glycylglycine (GG), Glycylserine (GS), Glycylalanine (GA), Glycylaspartic acid (GD), Glycylglutamic acid (GE), Glycylvaline (GV), Alanylserine (AS), Alanylglycine (AG), Alanylalanine (AA), Alanylaspartic acid (AD), Alanylglutamic acid (AE), Alanylvaline (AV), Aspartylserine (DS), Aspartylglycine (DG), Aspartylalanine (DA), Aspartylaspartic acid (DD), Aspartylvaline (DV), Glutamylserine (ES), Glutamylglycine (EG), Glutamylalanine (EA), Glutamylaspartic acid (ED), Glutamylglutamic acid (EE), Glutamylvaline (EV), Serinylserine (SS), Serinylalanine (SA), Serinylaspartic acid (SD), Serinylglutamic acid (SE), Serinylvaline (SV), Valinylserine (VS), Valinylalanine (VA), Valinylglycine (VG), Valinylaspartic acid (VD), Valinylglutamic acid (VE) を用いた。非タンパク性 アミノ酸を含むペプチドは, Sarcosylglycine, Glycylsarcosine, Glycyl-β-alanine, β-alaninylglycine, Alanyl-β-alanine, Alanylsarcosine, Sarcosinylalanineを示 した。無水物およびオリゴマーとして、Pyroglutamic acid, Glycine anhydride, Glycylglycylglycine (GGG), Gly-4mer (GGGGG), Gly-5mer (GGGGGG), Alanylalanylalanine (AAA) を用いた。標準試料は、 超純水もしくはpH1超純水に溶かして使用した。試 薬メーカーの公称値(純度)とされるものには, まれに予期しない不純物が混在していることがあ るため、純度確認のクロスチェックを行った。こ こで扱う短鎖ペプチド類および関連化合物の分子 情報(81種)をTables 1,2 に示した。

2.3. 試料の湿式操作および前処理の最適化

目的試料に含まれる有機・無機のマトリックス 効果を除去することは、イオン化効率の最適条件 に近づくことを意味し、ターゲット分子のシグナ ル/ノイズ比や分析確度を飛躍的に向上させるこ とは言うまでもない(e.g., Trufelli et al., 2011; Furey et al., 2013)。既報では、分析対象となる天 然物試料からターゲット分子の情報を有効に引き 出すため、適切な抽出・分画・精製の一連の前処 理フローの最適化を行い、ターゲット分子の高回 収率の保証を行ったので参照されたい(e.g., Takano et al., 2010; Takano et al., 2021)。

2.4. イオンペアクロマトグラフィーによる短鎖 ペプチドの分離と質量分析

短鎖ペプチド類は、誘導体化を行わず、液体ク ロマトグラフィー/電子スプレーイオン化質量分 析法(LC/ESI-MS, LC 1260 infinity and 6460 Triple Quadrupole MS system : Agilent Technologies Inc.) を用いて分析した(Takano et al., 2021)。分離カ ラムは、Hypercarb カラム(4.6 x 150mm, particle size 5 μ m ; Thermo Fisher Scientific Inc.)および同 ガードカラム(4.6 x 10mm, particle size 5 μ m)で行っ た。カラムおよびガードカラムは、カラムオーブ ン(Cool pocket column cooler, Thermo Fisher Scientific Inc.)で10.0℃に保持した。

溶離液は、A:20mM ノナフルオロ吉草酸水溶 液(Nonafluoropentanoic acid, NFPA;分子量 264.05)+0.1%ギ酸(formic acid),B:100%アセ トニトリル(分子量41.05)+0.1%ギ酸(formic acid)を用い、流速0.2mL/minで、0分(B液:0%) から60分(B液:60%)のリニアグラジエントで 行い、60-70分でバックフラッシュを行った後、 30分(B液:0%)の平衡化時間を確保した。分 析前と分析後の十分な平衡化により、分離および 保持時間の安定性を確保できる。

0.1%ギ酸添加の目的は、ポジティブイオンモー ドにおけるプロトンドナーである(Figure 2)。A 液とB液への0.1%ギ酸添加により、インバース グラジエントが図られ、電子スプレーイオン化効 率の安定性を担保できる(Takano et al., 2021)。 短鎖ペプチド類の検出は、前述のオンライン分離 で電子スプレーイオン化質量分析計(ESI,

Table 1 The representative separation of the underivatized short-chain peptides and other N-containing reference molecules showing abbreviation, chemical formula, retention time (min) on the hypercarb stationary column, exact mass, parent ions $[M+H]^+$, molecular weight, observed by the ion-pair liquid chromatography / electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI-MS; LC 1260 infinity and 6460 Triple Quadrupole MS system by Agilent Technologies Inc.). The Δt value was defined as the difference in retention time (min) between the two cross-combinations of the dipeptides (i.e., the time difference for X-Y versus Y-X with the same chemical formula and exact mass). Compiled after the literatures (Takano et al., 2015, 2021).

Short-chain peptides	Abbreviation	Formula	Retention time (min)	Exact Mass	Parent ions [M+H] ⁺	Molecular weight	Remarks	time	Δt
Glycyl-series									
Glycylglycine (GG)	Gly-Gly	$C_4H_8N_2O_3$	26.9	132.05	133.05	132.12			
Glycylserine (GS)	Gly-Ser	$C_5 H_{10} N_2 O_4$	26.9	162.06	163.06	162.15			
Glycylalanine (GA)	Gly-Ala	$C_5H_{10}N_2O_3$	30.2	146.07	147.07	146.15	cf. Ala-Gly	29.2	1.0
Glycylaspartic acid (GD)	Gly-Asp	$C_6H_{10}N_2O_5$	32.4	190.06	191.06	190.16	cf. Asp-Gly	32.3	0.1
Glycylglutamic acid (GE)	Gly-Glu	$C_7H_{12}N_2O_5$	35.2	204.07	205.07	204.18	cf. Glu-Gly	33.8	1.4
Glycylvaline (GV)	Gly-Val	$C_7 H_{14} N_2 O_3$	38.2	174.10	175.10	174.20	cf. Val-Gly	35.9	2.3
Alanyl-series									
Alanylserine (AS)	Ala-Ser	$C_6H_{12}N_2O_4$	28.4	176.08	177.08	176.17	cf. Ser-Ala	29.5	-1.1
Alanylglycine (AG)	Ala-Gly	$C_5H_{10}N_2O_3$	29.2	146.07	147.07	146.15	cf. Gly-Ala	30.2	-1.0
Alanylalanine (AA)	Ala-Ala	$C_6H_{12}N_2O_3$	30.7	160.08	161.08	160.17			
Alanylaspartic acid (AD)	Ala-Asp	$C_7H_{12}N_2O_5$	33.3	204.07	205.07	204.18	cf. Asp-Ala	32.6	0.7
Alanylglutamic acid (AE)	Ala-Glu	$C_8H_{14}N_2O_5$	35.7	218.09	219.09	218.21	cf. Glu-Ala	34.3	1.4
Alanylvaline (AV)	Ala-Val	$C_8H_{16}N_2O_3$	38.4	188.12	189.12	188.23	cf. Val-Ala	35.7	2.7
Aspartyl-series									
Aspartylserine (DS)	Asp-Ser	$C_7H_{12}N_2O_6$	31.9	220.07	221.07	220.18	cf. Ser-Asp	32.9	-1.0
Aspartylglycine (DG)	Asp-Gly	$C_6H_{10}N_2O_5$	32.3	190.06	191.06	190.16	cf. Gly-Asp	32.4	-0.1
Aspartylalanine (DA)	Asp-Ala	$C_7H_{12}N_2O_5$	32.6	204.07	205.07	204.18	cf. Ala-Asp	33.3	-0.7
Aspartylaspartic acid (DD)	Asp-Asp	$C_8H_{12}N_2O_7$	33.9	248.06	249.06	248.19	C X I 1 4	27.0	1.5
Aspartylvaline (DV)	Asp-Val	$C_9H_{16}N_2O_5$	39.4	232.11	233.11	232.24	cf. Val-Asp	37.9	1.5
Glutamyl-series		CH NO	22.0	224.00	225.00	001.01		24.0	2.0
Glutamylserine (ES)	Glu-Ser	$C_8H_{14}N_2O_6$	32.8	234.09	235.09	234.21	cf. Ser-Glu	34.8	-2.0
Glutamylglycine (EG)	Glu-Gly	$C_7H_{12}N_2O_5$	33.8	204.07	205.07	204.18	cf. Gly-Glu	35.2	-1.4
Glutamylaianine (EA)	Glu-Ala	$C_8H_{14}N_2O_5$	34.3	218.09	219.09	218.21	cī. Ala-Glu	35.7	-1.4
Glutamylaspartic acid (ED)	Glu-Asp	$C_9H_{14}N_2O_7$	36.4	262.08	263.08	262.22			
Glutamylgiutamic acid (EE)	Glu-Glu	$C_{10}H_{16}N_2O_7$	38.1	276.10	2/7.10	276.25		20.4	1.2
GlutamyIvaline (EV)	Giu-vai	$C_{10}H_{18}N_2O_5$	40.7	246.12	247.12	246.26	cī. val-Glu	39.4	1.3
Serinyi-series	C C	CHNO	267	102.07	102.07	102.17			
SeringIserine (SS)	Ser-Ser	$C_6H_{12}N_2O_5$	20.7	192.07	193.07	192.17	-£ Al- C	20.4	1.1
Serinylaanine (SA)	Ser-Ala	$C_6H_{12}N_2O_4$	29.5	1/0.08	221.07	1/0.1/	of Acr Ser	28.4	1.1
Serinylabytamia acid (SE)	Ser-Asp	$C_7 H_{12} N_2 O_6$	32.9	220.07	221.07	220.10	of Chy Sor	22.9	2.0
Serinylyaline (SV)	Ser-Ulu Ser Val	$C_{8}\Pi_{14}\Pi_{2}O_{6}$	34.8	204.11	205.11	204.21	of Val Ser	34.2	2.0
VarinyLearies	Sei-vai	C811161V2O4	57.0	204.11	205.11	204.25	ci. vai-sei	54.2	5.4
Valinylserine (VS)	Val-Ser	C.H. N.O.	34.2	204 11	205.11	204 23	cf Ser-Val	37.6	-34
Valinylalanine (VA)	Val-Ala	C.H. N.O.	35.7	188 12	189.12	188 23	cf Ala-Val	38.4	-2.7
Valinylglycine (VG)	Val-Gly	$C_8H_{16}N_2O_3$	35.9	174 10	175.10	174 20	cf Gly-Val	38.2	-2.3
Valinylaspartic acid (VD)	Val-Asn	$C_0H_1AV_2O_3$	37.9	232 11	233 11	232.24	cf Asn-Val	39.4	-1.5
Valinylglutamic acid (VE)	Val-Glu	CueHueN2O2	39.4	246.12	247 12	246.26	cf Glu-Val	40.7	-13
Nonprotein series	var ora	01011181 1203	57.1	210.12	217.12	210.20		10.7	1.0
Sarcosylglycine	Sar-Glv	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂	29.4	146.07	147 07	146 14	cf Gly-Sar	29.8	-0.4
Glycylsarcosine	Gly-Sar	$C_{s}H_{10}N_{2}O_{3}$	29.8	146.07	147.07	146.14	cf. Sar-Gly	29.4	0.4
Glycyl-β-alanine	Gly-BALA	$C_{s}H_{10}N_{2}O_{3}$	30.0	146.07	147.07	146.14	cf. BALA-Gly	31.2	-1.2
β-alaninylglycine	BALA-Gly	$C_{5}H_{10}N_{2}O_{3}$	31.2	146.07	147.07	146.14	cf. Glv-BALA	30.0	1.2
Alanyl-β-alanine	Ala-BALA	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	31.7	160.08	161.08	160.17			
Alanylsarcosine	Ala-Sar	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	31.9	160.08	161.08	160.17	cf. Sar-Ala	32.5	-0.6
Sarcosinylalanine	Sar-Ala	$C_6H_{12}N_2O_3$	32.5	160.08	161.08	160.17	cf. Ala-Sar	31.9	0.6
Other references									
Glycine	Gly	C ₂ H ₅ NO ₂	18.6	75.03	76.03	75.07			
α-Alanine	Ala	$C_3H_7NO_2$	25.2	89.05	90.05	89.09			
α-Aminobutyric acid	ABA	$C_4H_9NO_2$	30.4	103.06	104.06	103.12			
Norvaline	Nval	C ₅ H ₁₁ NO ₂	35.7	117.08	118.08	117.15			
Norleucine	Nleu	$C_6H_{13}NO_2$	40.4	131.09	132.09	131.18			
Glutamic acid	Glu	C ₅ H ₉ NO ₄	31.9	147.05	148.05	147.13			
Pyroglutamic acid	pGlu	C ₅ H ₇ NO ₃	26.1	129.04	130.04	129.12			
Glycine anhydride	DKP	$C_4H_6N_2O_2$	27.7	114.04	115.04	114.10			
Glycylglycylglycine (GGG)		$C_6H_{11}N_3O_4$	29.8	189.07	190.07	189.17			
Gly-4mer (GGGG)		$C_8H_{14}N_4O_5$	31.4	246.10	247.10	246.22			
Gly-5mer (GGGGG)		C10H17N5O6	32.4	303.12	304.12	303.27			
Alanine anhydride		$C_6H_{10}N_2O_2$	30.6	142.07	143.07	142.16			
Alanylalanylalanine (AAA)		C ₉ H ₁₇ N ₃ O ₄	32.9	231.12	232.12	231.25			
Methionylmethionine		$C_{10}H_{20}N_2O_3S_2\\$	49.8	280.09	281.09	280.40			

Table 2The monoisotopic mass comparison between theoretical parent ions (including the proton mass as $[M+H]^+$) and the measured
accurate mass $[M+H]^+$, and the $\Delta m/z$ value for short-chain peptides and representative isotopomers. The definition of $\Delta m/z$
was expressed as the mass differences between parent ions and measured accurate mass. The stable isotope probing (SIP) of 2
H (D)-, 15 N-isotopologue references are compiled from the literatures (e.g., Oba et al., 2016, 2017, 2019; Takano et al.,
2021).

Short-chain peptides	Formula	Monoisotopic mass	Parent ions [M+H]⁺	Measured mass [M+H] ⁺	$\Delta m/z$
Glycylglycine (GG)	$C_4H_8N_2O_3$	132.0535	133.0608	133.0607	0.0001
Glycylserine (GS)	$C_5H_{10}N_2O_4$	162.0641	163.0713	163.0715	-0.0002
Glycylalanine (GA)	$C_5H_{10}N_2O_3$	146.0691	147.0764	147.0765	-0.0001
Glycylaspartic acid (GD)	$C_{6}H_{10}N_{2}O_{5}$	190.0590	191.0662	191.0661	0.0001
Glycylglutamic acid (GE)	$C_7 H_{12} N_2 O_5$	204.0746	205.0819	205.0818	0.0001
Glycylvaline (GV)	$C_7 H_{14} N_2 O_3$	174.1004	175.1077	175.1079	-0.0002
Alanylserine (AS)	$C_6H_{12}N_2O_4$	176.0797	177.0870	177.0871	-0.0001
Alanylglycine (AG)	$C_5H_{10}N_2O_3$	146.0691	147.0764	147.0764	0.0000
Alanylalanine (AA)	$C_{6}H_{12}N_{2}O_{3}$	160.0848	161.0921	161.0922	-0.0001
Alanylaspartic acid (AD)	$C_7 H_{12} N_2 O_5$	204.0746	205.0819	205.0819	0.0000
Alanylglutamic acid (AE)	$C_8H_{14}N_2O_5$	218.0903	219.0975	219.0976	-0.0001
Alanylvaline (AV)	$C_{8}H_{16}N_{2}O_{3} \\$	188.1161	189.1234	189.1234	0.0000
Isotopologue references					
Amino acids					
Glycine	$C_2H_5NO_2$	75.0320	76.0393	76.0393	0.0000
<i>d</i> ₁ -Glycine	$C_2H_4DNO_2$	76.0383	77.0456	77.0456	0.0000
d ₂ -Glycine	$C_2H_3D_2NO_2 \\$	77.0446	78.0518	78.0518	0.0000
¹³ C ₁ -Glycine	$C^{13}CH_5NO_2$	76.0354	77.0426	77.0427	-0.0001
Sarcosine	$C_3H_7NO_2$	89.0477	90.0549	90.0550	-0.0001
d_1 -Sarcosine	$C_3H_6DNO_2$	90.0540	91.0612	91.0611	0.0001
d_2 -Sarcosine	$C_3H_5D_2NO_2$	91.0602	92.0675	92.0673	0.0002
d_3 -Sarcosine	$C_3H_4D_3NO_2 \\$	92.0665	93.0738	93.0737	0.0001
¹³ C ₁ -Sarcosine	$C_2{}^{13}CH_7NO_2$	90.0510	91.0583	91.0582	0.0001
Nucleobase					
Adenine	$C_5H_5N_5$	135.0545	136.0618	136.0618	0.0000
¹⁵ N-Adenine	$C_5 H_5{}^{15} N_5$	140.0397	141.0470	141.0470	0.0000
Cytosine	$C_4H_5N_3O$	111.0433	112.0506	112.0505	0.0001
¹⁵ N-Cytosine	$C_4 H_5^{15} N_3 O$	114.0344	115.0417	115.0417	0.0000
Thymine	$C_5H_6N_2O_2$	126.0429	127.0502	127.0503	-0.0001
¹⁵ N-Thymine	$C_5 H_6^{15} N_2 O_2$	128.0370	129.0443	129.0441	0.0002
Uracil	$C_4H_4N_2O_2$	112.0273	113.0346	113.0346	0.0000
¹⁵ N-Uracil	$C_4 H_4{}^{15} N_2 O_2$	114.0213	115.0286	115.0287	-0.0001
Purine	$C_5H_4N_4$	120.0436	121.0509	121.0509	0.0000
Pyrimidine	$C_4H_4N_2$	80.0375	81.0447	81.0447	0.0000
Hypoxanthine	$C_5H_4N_4O$	136.0385	137.0458	137.0458	0.0000
Xanthine	$C_5H_4N_4O_2$	152.0334	153.0407	153.0407	0.0000
Hexamethylenetetramine					
HMT	$C_6H_{12}N_4$	140.1062	141.1135	141.1136	-0.0001
d_1 -HMT	$C_6 D H_{11} N_4 \\$	141.1125	142.1198	142.1201	-0.0003
d_2 -HMT	$C_{6}D_{2}H_{10}N_{4} \\$	142.1187	143.1260	143.1260	0.0000
d ₃ -HMT	$C_6 D_3 H_9 N_4 \\$	143.1250	144.1323	144.1320	0.0003
d_4 -HMT	$C_6 D_4 H_8 N_4 \\$	144.1313	145.1386	145.1384	0.0002
d_{5} -HMT	$C_6 D_5 H_7 N_4 \\$	145.1376	146.1449	146.1447	0.0002
d_6 -HMT	$C_6 D_6 H_6 N_4 \\$	146.1439	147.1512	147.1511	0.0001
HMT-OH	$C_6H_{12}N_4O$	156.1011	157.1084	157.1083	0.0001



Figure 2 Scheme of inverse-gradient program to sustain a stable chromatographic separation and a stable electrospray ionization within a process time on LC/ESI-MS. We confirmed that the constant flow of 0.1% formic acid promoted an efficient stabilized ionization on the positive mode.

positive mode) へ導入し, 質量範囲 *m/z* 70-400で 行った。イオンソースの条件は, ドライガス窒素 温度280℃, ドライソースガス窒素流量 6 L/min, ネブライザー圧力45psi, キャピラリー電圧3500V で行った。ここで短鎖ペプチド類はイオン化され, 主に [M + H]⁺の形で検出される。分析目的に応 じた最適なイオンペア剤の候補は, 既報(例えば, Cecchi, 2008; Ristroph and Prud'homme, 2019など) が参照できる。

3. 結果と考察

3.1. 短鎖ペプチド類のクロマトグラフィーによ る分離

短鎖ペプチド類には、同じ化学組成で、同じ質 量数の分子が存在することから、クロマトグラ フィーによる分離が必須であり、オンライン質量 分析法の最適化が必要になる(次項3.2)。イ オンペアクロマトグラフィーによる代表的な短鎖 ペプチド類(G,A,D,V,E,S)の分離例をFigure 3 に示した。良好な分離であり、任意の質量数 (Extracted Ion chromatograms, EIC) で見ることで 更に明瞭に分子同定が可能になる。濃度既知のス タンダードを用いることで,シグナルの積分値か ら未知試料の濃度換算ができる。ダイナミックレ ンジを6桁のオーダーで直線性を確認している (Takano et al., 2021)。また,同分析ラインのトリ プル四重極質量分析計による多重反応モニタリン グ法 (Multiple Reaction Monitoring, MRM) により, femto mol (フェムトモル) スケールでの確度保 証を行っている (e.g., Isaji et al., 2020)。

本分析のHypercarb カラムでの分離条件では, メチレン鎖(-CH₂-)の伸長,および,オリゴマー 化の伸長に伴う保持時間の相関関係を数式化して おり,分離パターンを予測する際に有用である。 例えば,グリシン(C₂), α -アラニン(C₃), α -ア ミノ酪酸(C₄),ノルバリン(C₅),ノルロイシン (C₆)と保持時間(R_{time})の関係において, R_{time} = 5.41 Cn + 13.8(R^2 = 0.99);

the normal side-chain (n < 6)

が成立している (Table1)。

また、グリシンおよびアラニンの5量体オリゴ



→ Time (min)

Intensity

Figure 3 Chromatographic separation of the representative dipeptides on extracted ion chromatograms (EIC) of the corresponding m/z ([M+H]⁺ = parent ion) are shown. The retention time, exact mass, and parent ions for each underivatized dipeptide are summarized in Table 1. Abbreviations for Alanyl-X, Alanylserine (AS), Alanylglycine (AG), Alanylalanine (AA), Alanylaspartic acid (AD), Alanylglutamic acid (AE), Alanylvaline (AV); Glycyl-X, Glycylglycine (GG), Glycylserine (GS), Glycylalanine (GA), Glycylaspartic acid (GD), Glycylglutamic acid (GE), Glycylvaline (GV); Glutamylglycine (EG), Glutamylglutamic (EA), Glutamylglycine (EG), Glutamylglutamic acid (EE), Glutamylglycine (EG), Glutamylserine (SS), Serinylalanine (SA), Serinylgapartic acid (SD), Serinylglutamic acid (SE), Serinylvaline (SV); Valinylserine (VS), Valinylalanine (VA), Valinylglycine (VG), Valinylaspartic acid (VD), Valinylglutamic acid (VD), Aspartylvaline (DV). The preliminary chromatographic separations were reported in Takano et al. (2021). The asterisk (*) stands for an impurity.





23

マーと保持時間 (R_{time})の関係において, $R_{time} = 19.9 \log (Gly-n) + 13.6 (R^2 = 0.96);$

the glycyl-series (n < 5)

 $R_{time} = 16.4 \log (Ala-n) + 17.5 (R^2 = 0.99);$

the alanyl-series (n < 5)

が成立している(Takano et al., 2021)。無水物お よび5量体オリゴマーまでの分離について, Table 1 に示した。

3.2. 短鎖ペプチド類のマスフラグメントパターン

短鎖ペプチド類の代表的なマスフラグメントパ ターンをFigure 4 に示す。プロトンドナーとして の0.1%ギ酸添加によるインバースグラジエント は、 [M+H]⁺のプロダクトイオン生成を誘因す る。ゆえに、ESI-MSのポジティブモードでは、[M + H]⁺のプロダクトイオン(プロトン付加分子イ オン)が主体となる。分析上のバックグラウンド に由来するトレース量程度のNa⁺の存在によって、 ナトリウム付加イオン [M+Na]⁺が生じる一部の 分子種もある。アセトニトリルやメタノール系の 溶出系の場合, ESI ポジティブイオンモードにお けるマススペクトルは、プロトン付加かナトリウ ム付加であることが多く、[M + Na]⁺の出現は、 イオンソース内でのNa⁺イオンと親イオン [M]⁺ とのキレート形成能に依存しやすいとされる (e.g., Leitner et al., 2007; Kruve et al., 2013)。また, 分

析ラインの仕様やイオンソースの性状による差異 も考えられる(高野ら, 2015)。 まず,短鎖ペプチド類のマススペクトルには,構成

するアミノ酸の脱離により生成したイオンが見られる 分子種がある。例えば、セリニルバリン(Ser-Val)と バリニルセリン(Val-Ser)の親イオンは、[M+H]⁺ =205であり、各々バリン残基(-Val)およびセリン残 基(-Ser)の脱離による[Val+H]⁺と[Ser+H]⁺が観 測されている。同じフラグメント電圧での条件ながら、 バリニルアラニン(Val-Ala)やバリニルグリシ

ン (Val-Gly) が保有するアラニン残基 (-Ala) や グリシン残基 (-Gly) のフラグメント化は,起き にくい傾向がある。

次に, 短鎖ペプチド類のマススペクトルには, カルボキシル基 (-COOH)の脱離による生成し たイオン [M+H-HCOOH]*= [M+H-46]*が見 られる分子種がある。例えば, セリニルバリン

(Ser-Val) では、 [M + H - 46]⁺に対応するフラグ メントイオンが観測される。一方、同質量のバリ ニルセリン (Val-Ser) のマススペクトルからは、 フラグメントイオン [M+H-46]⁺が観測されない。 また、水(H₂O)の脱離によって生成したイオ ン [M+H-H₂O]⁺= [M+H-18]⁺が見られる場合 も多い。分子内にヒドロキシ基(-OH)を多く保 有するグルタミン酸ジペプチド(Glutamyl-X)の 場合. $[M + H]^+$ よりも $[M + H - H_2O]^+$ のフラグ メントイオンの方が生じやすい。このような特徴 は、 [M + H]⁺ による定量的計測を行う際, 導入 量に対する検出量を示す検量線によく現れてく る。アラニルアスパラギン酸(Ala-Asp)やアラ ニルグルタミン酸(Ala-Glu)の場合、脱離した アスパラギン酸残基(-Asp)やグルタミン酸残基 (-Glu)から、副次的な [M+H-46]⁺や [M+H-H₀]⁺ が観測されている。また. グルタミルセリ ン (Glu-Ser) やグルタミルアスパラギン酸 (Glu-Asp) のように、 $[M + H - 2H_2O]^+$ のフラグメント が観測される場合もある。

3.3. 短鎖ペプチド類の組合せと構造異性

前述のように短鎖ペプチド類のうち、ジペプチ ド (X-Y) には、同じ化学式かつ同質量のX-Yと Y-Xの組合せが存在する。例えば、グリシルアラ ニンとアラニルグリシンは、同組成 (C₅H₁₀N₂O), 同質量 (Exact Mass 146.0691), かつ, 分子極性 が近似しており、的確にクロマトグラフィーでの 分離を行わない限り、両者の分子同定はできな い。また、同質量である非タンパク性アミノ酸と の組み合わせを考慮する必要もある(例えば、グ リシル-β-アラニンとβ-アラニルグリシンの異性 体関係など)。既報では、組合せ(X-Y, Y-X)と その保持時間差(Δt, min)について解析し、良好 なベースライン分離の挙動を確認している(Takano et al., 2021)。例えば、グリシルアラニン (Gly-Ala) とアラニルグリシン (Ala-Gly) の保持時間差 (Δt) は、1.0minであり、セリニルバリン(Ser-Val)と バリニルセリン (Val-Ser) の保持時間差 (Δt) は, 3.4minであり、各々ベースライン分離が成立して いる(Table 1)。構造異性が近接している場合は、 ターゲット分子の co-injection 法(例えば, Oba et al., 2019) による直線近似からの濃度算出も有効



Figure 4 Summary for parent ions and the observed product ions by the ESI-MS for identifying underivatized short-chain peptides and anhydride references at the fragmentor voltage of 150 V. The preliminary mass fragmentation (e.g., glycylaspartic acid, alanylalanine, methionylmethionine, and serinylglutamic acid) were reported in Takano et al. (2021).

























である。

Figure 4 に示すように、L-アスパラギン酸二量 体 (Aspartylaspartic acid) からなるジペプチドの 構造異性体には、α-型とβ-型がある。天然物試 料からは、アスパラガス (Asparagus officinalis) からα-, β-の双方が検出された例がある (Kasai et al., 1981)。また、分子進化のモデル実験生成物 としてもα-, β-の双方が報告されている (e.g., Saetia et al., 1993)。同様に, 分子内にカルボキシ ル基を2つ有するL-グルタミン酸二量体 (Glutamylglutamic acid) にも構造異性が存在する。 α-型に加え、アスパラギン酸よりメチレン鎖 (-CH₂-) が. 一つ多いのでγ-型の構造異性を持つ ことが知られる。同組成・同質量でのアミノ酸類 や短鎖ペプチド群の同定は、異なる分離条件 (e.g., Oba et al., 2016, 2019) や異なる分離モード (e.g., Ozawa et al., 2020) での相互検証により, 分析確 度を保証できる。

3.4. 短鎖ペプチド類およびモノマーアミノ酸の 無水物

アミノ酸の二量体であるジペプチド分子は、分子 内のアミノ基とカルボキシル基を脱水縮合し、環状 ペプチド (無水物)を形成することがある。例えば、 グリシルグリシン (Glycylglycine : $C_4H_8N_2O_3$, Exact Mass 132.0535) の場合、ジケトピペラジン (Diketopiperazine, DKP : $C_4H_6N_2O_2$, Exact Mass 114.0429)の無水物が、それに相当する。環状ペプ チドは、水質変成を受けることで開環する(Figure 5)。無水物の比較として、グルタミン酸モノマーの 分子内脱水で生じるピログルタミン酸の分離も Table1に示した。グルタミン酸に対する誘導体化を 行う場合、まれに、分子内脱水によるピログルタミ ン酸生成の副反応を起こす誘導体化法 (e.g., 山口ら, 2009; Hušek, 1991) があるので、留意が必要である。 N-ピバロイル/イソプロピルエステル誘導体化法や N-ピバロイル/イソブチルエステル誘導体化法では. そのような副反応やアーティファクトは生じず、分 析確度の保証を報告している (e.g., Chikaraishi et al., 2009, 2010 ; Takano et al., 2009, 2010).

3.5.精密質量分析法および SIP 法への応用

本分離法を各ターゲット分子の保持時間とマス スペクトルを比較することにより、短鎖ペプチド 類および関連分子の精密質量分析法へ応用でき る。既報では、オービトラップ質量分析法による 短鎖ペプチドの理論値および分析値の精密質量差 $(\Delta m/z)$ を示した (Table 2)。また、参照データ として, 既報のSIP法 (Stable Isotope Probing) に よる²H(D)-, ¹³C-, ¹⁵N-を分子内に含むアミノ酸や 核酸塩基など、窒素分子レファレンスのアイソト ポマーの実測値を比較で示した。分析フローの最 適化および試料由来の無機・有機マトリックス効 果を除去・制御 (e.g., Oba et al., 2019; Takano et al., 2021) したこともあり、いずれも非常に良い 分析確度(Δ*m/z*< 0.0003)が保証されている。イ メージング法としてのMALDI法(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) やDESI法(Desorption ElectroSpray Ionization) などとのカップリングも 期待される (e.g., Cornett et al., 2007; Naraoka and Hashiguchi, 2019).

4. 今後の展望

短鎖ペプチド類のクロマトグラフィー分離に関して. 十分な最適化が行われている場合、質量分析計の代 わりに、例えば、コロナ荷電化粒子検出器 (Corona Charged Aerosol Detector, CAD : cf. Takano et al., 2015, 2021). あるいは、蒸発光散乱検出器 (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD : Takano et al., 2015) による検出法への適用が可能である。Corona CADは、定量性に優れ、質量分析法やフォトダ イオードアレイ検出法を補完する検出装置として 有効である (e.g., Ishikawa et al., 2018a, 2018b; Furota et al., 2018; Sun et al., 2020)。 ターゲット 短鎖ペプチド類を1次元LCで分離・精製し、必 要性に応じてLCやGCなど、2次元目のクロマ トグラフィーへの展開できる (cf. Takano et al., 2021)。さらに、ターゲット短鎖ペプチド類につ いて、分子レベルの同位体質量分析法や加速器質 量分析法などへの応用することも可能である。

短鎖ペプチド類の潜在的役割は,生化学や薬理 学に限定されるものではなく,地球化学的あるい は微生物生態学的にも重要な示唆を与えている



Figure 5 Typical dehydration and hydrolysis processes for the cyclic molecular formation on short-chain peptides and amino acids. (a) Intermolecular reaction showing two glycine molecules and glycine anhydride (2,5-Diketopiperazine, DKP), twoα-alanine molecules and α-alanine anhydride (3,6-Dimethyl-2,5-piperazinedione). (b) Intramolecular reaction showing single glutamic acid and pyroglutamic acid (pGlu).

(e.g., Nichols et al., 2008; Mulholland and Lee, 2009; Farrell et al., 2011)。フラグメンテーション パターンのデータベースを得ておくことは、オン ライン質量分析法のみならず、オフライン質量分 析法(例えば、前述のMALDI, DESIあるいは DART: Direct Analysis in Real Time など)や二次 元イメージング質量分析法のレファレンスデータ としても有用である。

謝 辞

本稿は、2名の匿名査読者から貴重な意見や提案 を頂き、最終稿に反映させた。謝意を付記する。 本研究の一部は、日本有機地球化学会による地 球・環境有機分子質量分析マニュアル化事業の一 環(オリジナルデータスペクトルライブラリー) として、既報で掲載していない補足知見と併せて まとめた。また、学術講演や専門課程での講義等 で触れられることの少ない分析上の留意点につい ても付記した。本研究の一部は、文部科学省 (MEXT)の科学研究費補助金(No. 20H02019; Y.T.)および北海道大学低温科学研究所共同研 究推進プログラムの一環(YO, YT)として行った。

引用文献

- 赤堀四郎・泉 美治(1956)必須アミノ酸の合成. 有機合成化学協会誌 14,367-378.
- Cecchi T. (2008) Ion pairing chromatography. *Critical Rev. Anal. Chem.* **38**, 161-213.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, O. N., Kashiyama, Y., Takano,Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato,H. and Ohkouchi, N. (2009) Determination of aquatic food-web structure based on compound-

specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnol. & Oceanogr.: Methods*, **7**, 740-750.

- Chikaraishi Y., Takano Y., Ogawa O. N., and Ohkouchi, N. (2010) Instrumental optimization for compoundspecific nitrogen isotope analysis of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Earth, Life, and Isotopes* (edited by N. Ohkouchi, I. Tayasu, and K. Koba). Kyoto Univ. Press., pp. 367-386.
- Cornett, D.S., Reyzer, M.L., Chaurand, P. and Caprioli, R.M. (2007) MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems. *Nature Methods* 4, 828-833.
- Farrell, M., Hill, P. W., Wanniarachchi, S. D., Farrar, J., Bardgett, R. D. and Jones, D. L. (2011) Rapid peptide metabolism: A major component of soil nitrogen cycling? *Global Biogeochem. Cycles* 25, GB3014.
- Furey, A., Moriarty, M., Bane, V., Kinsella, B. and Lehane, M. (2013) Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta* **115**, 104-122.
- Furota, S., Ogawa, N.O., Takano, Y., Yoshimura, T. and Ohkouchi, N. (2018) Quantitative analysis of underivatized amino acids in the sub- to severalnanomolar range by ion-pair HPLC using a coronacharged aerosol detector (HPLC-CAD). *J. Chromatogr: B*, **1095**, 191-197.
- Gilbert, E., Wong, E. and Webb Jr, K. (2008) Boardinvited review: peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. J. Animal Sci., 86, 2135-2155.
- Hare, P. (1969) Geochemistry of proteins, peptides, and amino acids. Organic Geochemistry, Springer, pp. 438-462.
- Hušek, P. (1991) Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids. J. Chromatogr. A, 552, 289-299.
- 池田菊苗(1908) グルタミン酸を主成分とせる調 味料の製造法.日本国特許, 14805.
- Isaji, Y., Ogawa, N. O., Takano, Y. and Ohkouchi, N. (2020) Quantification and carbon and nitrogen isotopic measurements of heme B in environmental

samples. Anal. Chem., 92, 11213-11222.

- Ishikawa, N. F., Chikaraishi, Y., Takano, Y., Sasaki, Y., Takizawa, Y., Tsuchiya, M., Tayasu, I., Nagata, T. and Ohkouchi, N. (2018a) A new analytical method for determination of the nitrogen isotopic composition of methionine: its application to aquatic ecosystems with mixed resources. *Limnol. & Oceanogr.: Methods*, 16, 607-620.
- Ishikawa, N. F., Itahashi, Y., Blattmann, T. M., Takano, Y., Ogawa, N. O., Yamane, M., Yokoyama, Y., Nagata, T., Yoneda, M., Haghipour, N., Eglinton, T. I. and Ohkouchi, N. (2018b) An improved method for isolation and purification of underivatized amino acids for radiocarbon analysis. *Anal. Chem.*, **90**, 12035-12041.
- Kasai, T., Hirakuri, Y. and Sakamura, S. (1981) Aspartyl and glutamyl peptides and the acidic cysteine derivatives in asparagus (Asparagus officinalis) shoots. Agricul. Biol. Chem., 45, 433-437.
- Kruve, A., Kaupmees, K., Liigand, J., Oss, M. and Leito, I. (2013) Sodium adduct formation efficiency in ESI source. J. Mass Spectrom., 48, 695-702.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132.
- Leitner, A., Emmert, J., Boerner, K. and Lindner, W. (2007) Influence of solvent additive composition on chromatographic separation and sodium adduct formation of peptides in HPLC-ESI MS. *Chromatogr.*, **65**, 649-653.
- Matthews, D.M. and Adibi, S.A. (1976) Peptide absorption. *Gastroenterol.*, **71**, 151-161.
- Mulholland, M. R. and Lee, C. (2009) Peptide hydrolysis and the uptake of dipeptides by phytoplankton. *Limnol. & Oceanogr.*, **54**, 856-868.
- Munegumi, T. (2010) Hydrophobicity of peptides containing d-amino acids. *Chem. Biodiversity*, 7, 1670-1679.
- Naraoka, H. and Hashiguchi, M. (2018) In situ organic compound analysis on a meteorite surface by desorption electrospray ionization coupled with an Orbitrap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass*

Spectrom., 32, 959-964.

- Nichols, D., Lewis, K., Orjala, J., Mo, S., Ortenberg, R., O'Connor, P., Zhao, C., Vouros, P., Kaeberlein, T. and Epstein, S. (2008) Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4889-4897.
- Oba, Y., Takano, Y., Watanabe, N. and Kouchi, A. (2016) Deuterium fractionation on the formation of amino acids by photolysis of interstellar ice analogues containing deuterated methanol. *Astrophys. J. Lett.*, 827, L18.
- Oba, Y., Takano, Y., Naraoka, H., Watanabe, N. and Kouchi, A. (2017) Deuterium fractionation upon the formation of hexamethylenetetramines through photochemical reactions of interstellar ice analogs containing deuterated methanol isotopologues. *Astrophys. J.*, 849, 122 (9pp).
- Oba, Y., Takano, Y., Naraoka, H., Watanabe, N. and Kouchi, A. (2019) Nucleobase synthesis in interstellar ices. *Nature Commun.*, **10**, Article number: 4413.
- Osborne, T.B., Mendel, L.B., Ferry, E.L. and Wakeman, A.J. (1914) Amino-acids in nutrition and growth. J. Biol. Chem., **17**, 325-349.
- 太田博之(1974)アミノ酸工業の展望. 有機合成 化学協会誌 32, 480-486.
- Ozawa, H., Hirayama, A., Ishikawa, T., Kudo, R., Maruyama, M., Shoji, F., Doke, T., Ishimoto, T., Maruyama, S. and Soga, T. (2020) Comprehensive dipeptide profiling and quantitation by capillary electrophoresis and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **92**, 9799-9806.
- Pittman, K.A., Lakshmanan, S. and Bryant, M.P. (1967) Oligopeptide uptake by *Bacteroides ruminicola. J. Bacteriol.*, **93**, 1499-1508.
- Ristroph, K.D. and Prud'homme, R.K. (2019) Hydrophobic ion pairing: encapsulating small molecules, peptides, and proteins into nanocarriers. *Nanoscale Adv.*, **1**, 4207-4237.
- Saetia, S., Liedl, K.R., Eder, A.H. and Rode, B.M. (1993) Evaporation cycle experiments-a simulation of salt-induced peptide synthesis under possible

prebiotic conditions. Origins Life Evol. Biosph., 23, 167-176.

- Silk, D., Grimble, G. and Rees, R. (1985) Protein digestion and amino acid and peptide absorption. *Proc. Nutrition Soc.*, 44, 63-72.
- Sun, Y., Ishikawa, N.F., Ogawa, N.O., Kawahata, H., Takano, Y. and Ohkouchi, N. (2020) A method for stable carbon isotope measurement of underivatized individual amino acids by multi-dimensional highperformance liquid chromatography and elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 34, e8885.
- Takano, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, O. N., Kitazato, H. and Ohkouchi, N. (2009) Compound-specific nitrogen isotope analysis of D-alanine, L-alanine, and valine: application of diastereomer separation to delta 15 N and microbial peptidoglycan studies. *Anal. Chem.*, 81, 394-399.
- Takano, Y., Kashiyama, Y., Ogawa, O.N., Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2010) Isolation and desalting with cation-exchange chromatography for compoundspecific nitrogen isotope analysis of amino acids. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 24, 2317-2323.
- Takano, Y., Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2015) Isolation of underivatized amino acids by ion-pair high performance liquid chromatography for precise measurement of nitrogen isotopic composition of amino acids: Development of comprehensive LC x GC/C/IRMS method. *Int. J. Mass Spectrom.* 379, 16-25.
- Takano, Y., Oba, Y., Furota, S., Naraoka, H., Ogawa, N.O., Blattmann, T.M. and Ohkouchi, N. (2021) Analytical development of seamless procedures on cation-exchange chromatography and ion-pair chromatography with high-precision mass spectrometry for short-chain peptides. *Int. J. Mass Spectrom.*, 462, 116529.
- 高野 淑識, 力石 嘉人, 大河内 直彦 (2015) イオン ペアクロマトグラフィー/電子スプレーイオン 化質量分析法 (LC/ESI-MS) によるアミノ酸の マススペクトル解析. *Res. Org. Geochem.*, **31**, 33-49.
- Trufelli, H., Palma, P., Famiglini, G. and Cappiello, A.

(2011) An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, **30**, 491-509.

- 山口保彦・力石嘉人・横山祐典・大河内直彦 (2009) 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. Res. Org. Geochem., 25, 71-82.
- 吉田 昭(1984) 食品栄養学の源流 ビタミン・必 須アミノ酸の発見をめぐって. 化学と生物, 22, 583-590.

Abbreviations.

LC/MS, Liquid Chromatography / Mass Spectrometry; ESI-MS, Electrospray Ionization-Mass Spectrometry; EIC, Extracted Ion Chromatogram; MRM, Multiple Reaction Monitoring; NFPA, Nonafluoropentanoic acid; Corona CAD, Corona Charged Aerosol Detector; ELSD, Evaporative Light Scattering Detector; MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization; DESI, Desorption ElectroSpray Ionization; DART, Direct Analysis in Real Time; SIP, stable isotope probing; DKP, 2,5-Diketopiperazine.



D-Alanyl-L-valine



L-Alanyl-D-valine



D-Alanyl-D-valine

Chemical Formula: $C_8H_{16}N_2O_3$ Exact Mass: 188.12 Molecular Weight: 188.23

Appendix-1 Structure of underivatized alanylvaline for LL-, LD-, DL-, DD- diastereomers.



Appendix-2 Structure of underivatized N-heterocyclic molecules discussed in the isotopologue references in Table 2.