

**技術論文**アミノ酸 (ピバロイル/イソブチルエステル誘導体) の  
GC/MS による解析\*高野 淑識<sup>\*\*,\*\*\*</sup>・力石 嘉人<sup>\*\*</sup>・大河内 直彦<sup>\*\*,\*\*\*\*</sup>

(2016年3月14日受付, 2016年7月14日受理)

**Abstract**

We report an analytical procedure of gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) focusing on chromatographic enantiomer separations and the corresponding mass spectra. We used N-pivaloyl isobutyl esters of amino acids to show the summary of retention time and those of mass fragmentation patterns. To avoid matrix effect from biogeochemical samples, we optimized the entire experimental flow showing an optional wet chemical treatment for the purification of amino acids. We separated both of protein and non-protein type amino acids derived from the samples, including prokaryotic soft-tissues, freshwater/marine biological hard-tissues, and a deep-sea serpentine sample. Present derivatization procedures of amino acids as pivaloyl/isobutyl esters can be switchable on the diastereomers with the use of *S*(+)-2-butyl esters or *R*(-)-2-butyl esters. The present method will be applied into a further description of enantiomer-specific isotopic composition of individual amino acid.

**1. はじめに**

アミノ酸は、アミノ基 (-NH<sub>2</sub>) とカルボキシル基 (-COOH) を保有する有機分子である。生体を主に構成するタンパク質の基本分子であり、代謝や生理機能の維持に深く関わる。まず、タンパク質アミノ酸の中心炭素の  $\alpha$ -位には、水素 (-H) がある。炭素は、原子価が4であるから、 $\alpha$ -位にアミノ基、カルボキシル基ともう一つ R-基が付加することにより、分子構造の多様性が生まれる。アミノ酸は、生体内での有機分子の動態だけでなく、有機地球

化学、生態学、医学、人類学、考古学など、分野横断的な研究対象になっている (例えば, Abelson, 1954; Abelson and Hoering, 1961; Goodfriend et al., 2000; Michener and Lajtha, 2007; Ohkouchi et al., 2010)。次に、 $\alpha$ -位の炭素は、鏡像異性の中心 (キラールセンター) になり、D-体とL-体の光学異性アミノ酸を生み出す。また、アミノ酸には、 $\alpha$ -アミノ酪酸、 $\beta$ -アラニン、 $\gamma$ -アミノ酪酸のような非タンパク質アミノ酸も存在することから、地球物質中だけでなく、地球外物質中の起源や物質進化のプロセス研究においても常に注目される有機分子で

\*GC/MS analysis of amino acids as pivaloyl/isobutyl esters

\*\*国立研究開発法人 海洋研究開発機構, 生物地球化学研究分野 〒237-0061 横須賀市夏島町2-15  
Department of Biogeochemistry, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC),  
2-15 Natsushima, Yokosuka, Kanagawa 237-0061, Japan  
Yoshinori Takano, Yoshito Chikaraishi, Naohiko OhkouchiCorrespondence, E-mail: [takano@jamstec.go.jp](mailto:takano@jamstec.go.jp), Fax: +81-46-867-9775

\*\*\*東京大学大学院理学系研究科 〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

Department of Earth and Planetary Sciences, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Tokyo 113-0033, Japan

\*\*\*\*東京工業大学大学院 総合理工学研究科 〒226-8502 横浜市緑区長津田4259

\*\*\*\*Department of Environmental Science and Technology, Tokyo Institute of Technology,  
4259 Nagatsuda, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8502, Japan

ある(例えば, Cronin and Chang, 1993; Palyi et al., 1999; Ehrenfreund and Charnley, 2000; Meierhenrich, 2008; Ohkouchi and Takano, 2014)。

GC/MSによるアミノ酸の分析手順は, (1) 試料の酸加水分解, (2) 精製と誘導体化, (3) GC/MSでの測定, という基本構成である。アミノ酸に揮発性を持たせるために, いくつかの誘導体化法が知られている。代表的な分離手法として, トリフルオロアシル/イソプロピルエステル化(TFA/*i*Pr: 例えば, GilAv et al., 1966; Stolting and Konig, 1976)をはじめ, トリフルオロアシル/イソブチルエステル化(TFA/*i*Bu: 例えば, Kvenvolden et al., 1970), 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), *tert*-ブチルジメチルシリル化(*t*-BDMS: 例えば, MacKenzie et al., 1987), ペンタフルオロアシル/イソプロピルエステル化(PFA/*i*Pr: 例えば, Pelz et al., 1998), ピバロイル/イソプロピルエステル化(Pv/*i*Pr: 例えば, Metges et al., 1996), ピバロイル/ノルマルプロピルエステル化(Pv/*n*-Pr: 例えば, Metges et al., 1996), などが挙げられる。

一方, 代表的な検出方法は, オンラインでの電子衝撃法(Electron Impact, EI)によるイオン化部と検出部(四重極型等)からなる質量分析法が挙げられる。最初に分子イオン $M^+$ を生成し, 過剰な内部エネルギーにより分子構造に依存したフラグメンテーションが起こり, フラグメントイオンが生じる。分子イオンがどの程度保存されるかは, 対象となる分子構造によって異なる。また, 加速電圧を変えると, 生成するイオン量やフラグメンテーションに揺らぎ(例えば, 土屋ら, 1965)が出るので, 標準試料を用いたクロマトグラフィーでの保持時間の検証が重要になる。

本稿では, ピバロイル/イソブチルエステル誘導体化(Pv/*i*-Bu)とGC/MS法によるマススペクトルを紹介する。アミノ酸のピバロイル/イソブチルエステル誘導体化は, GC/MSの統合マススペクトルライブラリー(例えば, NIST スペクトルデータベース: <http://www.nist.gov/>)にデータベース化されていない。イソブチルエステル基は, *S*-(+)-2-ブタノール, あるいは, *R*-(-)-2-ブタノールに由来する。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ことから, 分離ラインや検出器

へのダメージが少ない(例えば, Meier-Augenstein, 2004), (2) 誘導体化体アミノ酸が比較的安定である, (3) *D*-, *L*-光学異性アミノ酸の分離が可能, という特徴がある。このため, ガスクロマトグラフィー/同位体比質量分析法(GC/IRMS)による分子レベル(Compound-specific), もしくは, 光学異性体分子レベル(Enantiomer-specific)の安定窒素同位体比分析においても有用な誘導体化法である。

## 2. 試料

*D*-アミノ酸を有する代表試料として, まず, バクテリア由来(*Staphylococcus staphylolyticus*, *Enterococcus faecalis*)のペプチドグリカン組織を用いた(Takano et al., 2009)。次に, 陸水性の甲殻類試料として, 神奈川県湯河原町の陸水域で採取されたヤマトヌマエビ(*Caridina multidentata*), 食用に養殖された牛海老(ブラックタイガー: *Penaeus monodon*)の尻尾の甲殻部分(硬組織)を用いた。海洋性の甲殻類試料として, 神奈川県湯河原町の吉浜海岸で採取されたショウジンガニ(*Plagusia dentipes*: Chikaraishi et al., 2014), 相模湾中央部の深海底で採取されたハオリムシ(チューブワーム: *Lamellibrachia*: 藤倉ほか, 2008)の外殻部の硬組織を用いた。また, 岩石試料として, 大西洋中央海嶺の深海底で採取された蛇紋岩試料を用いた(Bassez et al., 2009)。アミノ酸の同定は, 標準試料(Chikaraishi et al., 2010; Takano et al., 2015)の保持時間およびマススペクトルとの一致から行った。

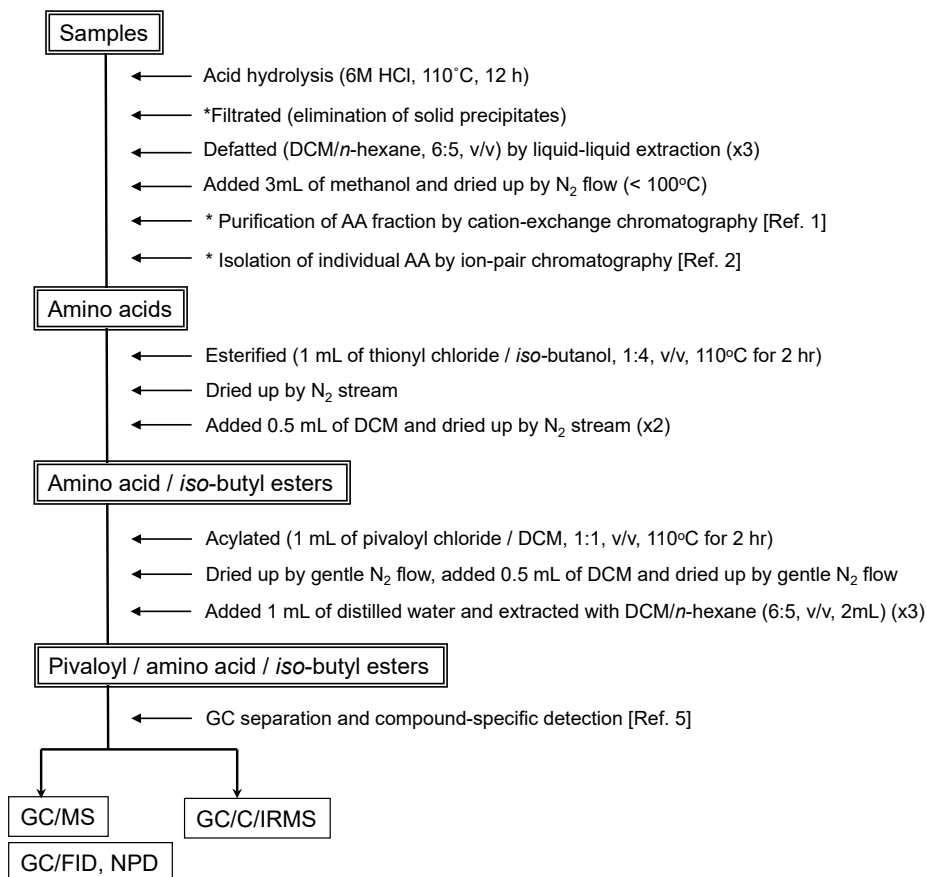
## 3. 分析方法

### 3.1. アミノ酸の抽出と前処理

アミノ酸の抽出・誘導体化の分析手順を Fig. 1 に示す。乾燥済みのバクテリア由来ペプチドグリカン粉体試料 1 mg, 生物の甲殻試料 1–5 mg, 岩石試料 (<500 mg) を濃塩酸 (>6 M) で酸加水分解し (110°C, 12 hr), 試料に含まれるタンパク質やペプチド等をアミノ酸へ分解した。酸加水分解を行っているため, アスパラギンとグルタミンは, それぞれアスパラギン酸とグルタミン酸に変換される。加水分解した塩酸水溶液を有機溶媒(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 (Chikaraishi et al., 2009; Takano et al., 2009)。アミノ酸の誘導体化を阻害するマトリックス (夾雑物) を多く含む試料は、誘導体化を阻害する可能性があるため、必要に応じて、イオン交換クロマトグラフィー (Biorad 社製 AG50W-X-8, 200–400 mesh) により、アミノ酸画分を精製した (Takano et al., 2010a)。次に、塩化チオニル/イソブタノール

(ここでは、*S*-(+)-2-butanol を使用、110°C, 2 hr) でイソブチル化し、続いて、塩化ピバロイル/ジクロロメタン (110°C, 2 時間) でピバロイル化し、アミノ酸のピバロイル/イソブチルエステル誘導体 (ピバロイル/*S*-2-ブチルエステル誘導体) を得た。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、未反応の塩化ピバロイルを水層に移し、アミノ酸のピバロイル/イソブチ



**Fig. 1.** Experimental flow and derivatization procedures of amino acids as pivaloyl/isobutyl esters (cf. pivaloyl/isopropyl esters, Metges et al., 1996; Ref.4, Chikaraishi et al., 2010). The alternate detectors are flame ionization detector (FID) and nitrogen-phosphorus detector (NPD) in prior to isotope ratio mass spectrometer (IRMS). The asterisk [\*] stands for an optional process. Ref. 1 is for Takano et al. (2010a); the cation-exchange ion chromatography is for the purification of amino acid to avoid matrix effect during the esterification and acylation. Ref. 2 is for Takano et al. (2015); the preparative isolation of underivatized amino acids for targeting analysis by ion-pair high performance liquid chromatography. Note that a comparative study of GC separation using polar and apolar stationary phases was performed with some capillary columns of Chirasil-Val (50 m x 0.32 mm i.d., 0.20 μm film thickness, Alltech Associates Inc.), DB-23 (30 m x 0.32 mm i.d., 0.25 μm, Agilent Technologies), DB-35 (30 m x 0.32 mm i.d., 0.50 μm, Agilent Technologies), NDB-FFAP (30 m x 0.32 mm i.d., 0.25 μm, Agilent Technologies), HP-1MS (30 m x 0.32 mm i.d., 1.0 μm, Agilent Technologies), HP-Chiral-20β (30 m x 0.32 mm i.d., 0.25 μm, Agilent Technologies), HP-INNOWAX (30 m x 0.32 mm i.d., 0.50 μm, Agilent Technologies) (Chikaraishi et al., 2010).

ルエステル誘導体を有機層に回収し、ごく緩やかな窒素気流下で濃縮乾固した。Fig.2 にジアステレオマー化の反応機構を示した。

ここでは、標準試薬として用いるアミノ酸の光学純度 (>99%)、誘導体化試薬として用いるインブタノールの光学純度 (>99.0%) に留意して分析を行った (Takano et al., 2009)。液相塩酸と気相塩酸を用いた加水分解によるアミノ酸のラセミ化とその補正については、既報に解説されている (例えば, Kaiser and Benner, 2005)。

### 3.2. GC/MS 法

GC-MS は, Agilent Technologies 社製ガスクロマトグラフ-質量分析計 (6890N/5973MSD) を用いた。導入法は, PTV 法 (Programmable Temperature Vaporization, Gerstel 社製) を用い, 分離キャピラリーカラムは, HP-5ms (30 m x 0.32 mm i.d., 0.52  $\mu$ m

膜厚; Agilent Technologies) を用いた。昇温条件は, 40°C で 4 分保持し, 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 を 10 分間保持した。ヘリウムキャリアーガス (He) は, 1.4 mL / 分の定速流モード (constant flow) で行った。質量分析は, 電子衝撃法 (70 eV) でイオン化し,  $m/z$  40–550 の質量範囲で測定した。試料の導入量は, GC/IRMS 法での計測 (評価量レンジ: >1–10 nmol の分析スケール) を念頭に試料の調整を行った (Chikaraishi et al., 2010)。アミノ酸の定量を行う場合, flame ionization detector (FID) や nitrogen-phosphorus detector (NPD) 検出器を用いる方が, より定量的な議論が可能となる (Chikaraishi et al., 2015)。既報の分析手順の詳細 (Chikaraishi et al., 2010; Takano et al., 2010a, 2010b) も併せて参照されたい。

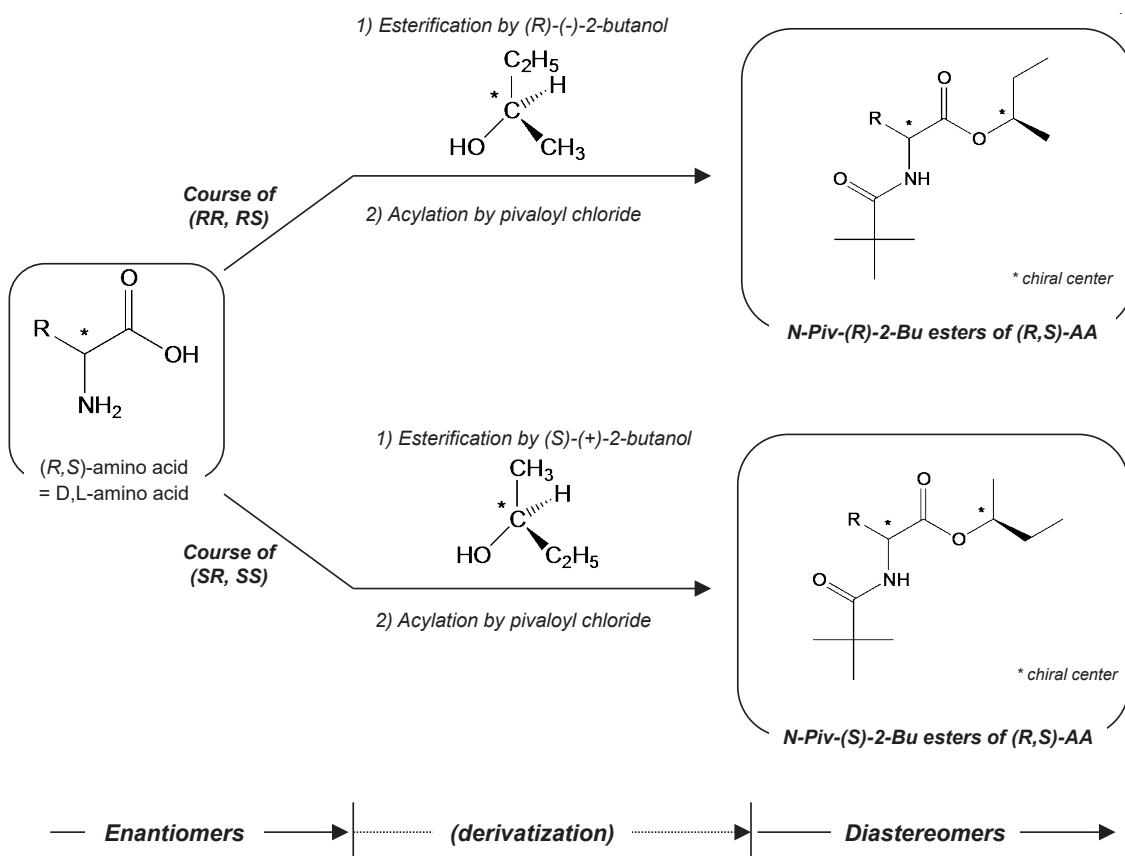


Fig.2. Reaction pathway and switching procedure of diastereomeric (*R*, *S*)-amino acid derivatives using (*R*)-(-) or (*S*)-(+)-2-butanol and pivaloyl chloride for esterification and acylation, respectively (Takano et al., 2009).

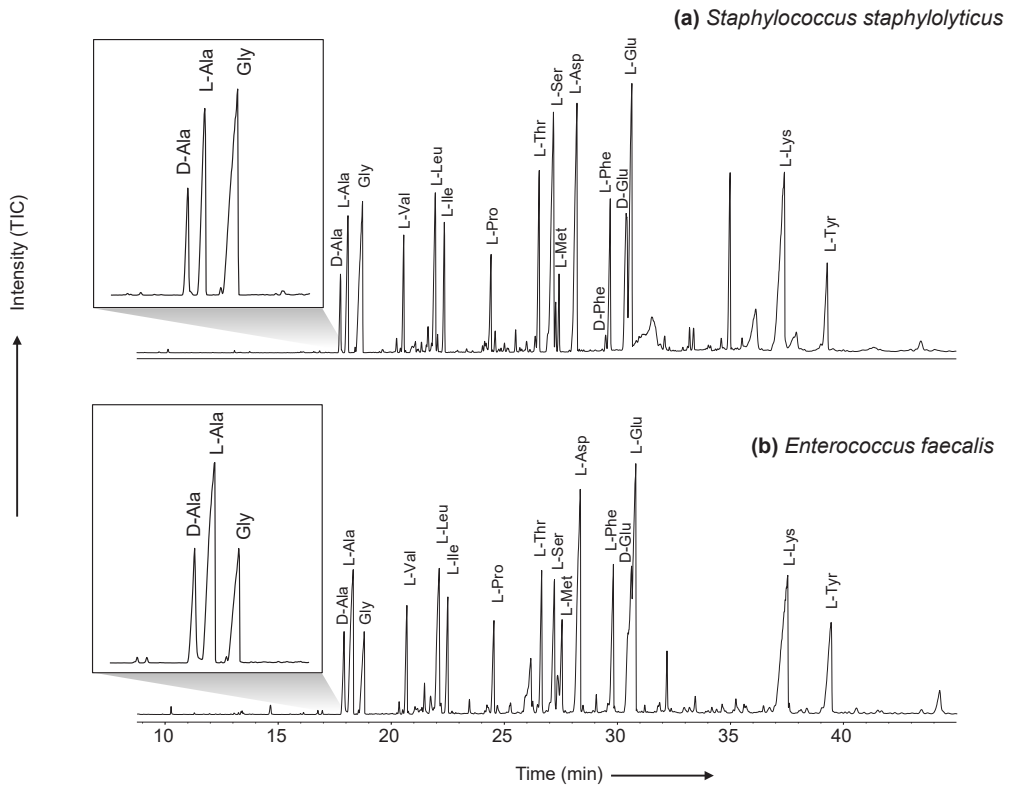
#### 4. 分析結果

##### 4.1. アミノ酸 (ピバロイル/イソブチルエステル誘導体) の分離とマスフラグメンテーション

Fig.3 に分析で得られた TIC クロマトグラムを示す。バクテリアのペプチドグリカン組織には、D-アラニンおよび D-グルタミン酸がそれぞれ 30% 程度含まれることがわかる。ラセミ体アミノ酸では、D-アミノ酸含有量は、最大 50% であるからペプチドグリカン由来の D-アミノ酸含有率は際だっている。ここで示したクロマトグラムのように、イソブタノールに *S*-(+)-2-ブタノールを用いた場合、キラル中心を持つアミノ酸は、ジアステレオマーとして、D-アミノ酸、L-アミノ酸の順番で検出される。反対に、*R*-(-)-2-ブタノールを用いた場合、溶出順序は逆になる (Takano et al., 2009)。

アミノ酸のピバロイル/イソブチルエステル誘導

体の基本的なマスペクトルは、親イオン  $[M]^+$  に加え、イソブチルエステル基が脱離した  $[M-73]^+$ 、カルボニル基が脱離した  $[M-101]^+$ 、および、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である。イソブチル基も  $[57]^+$  のフラグメントを一部供与する。例えば、 $\alpha$ -アミノ酪酸 (中性アミノ酸：分子内にカルボキシル基とアミノ基を 1 つ保有) のマスペクトルは、 $[M]^+$  が 243 であり、 $[M-73]^+$ 、 $[M-101]^+$  に対応する  $m/z$  170、 $m/z$  142、ピバロイル基と *tert*-ブチル基 (およびイソブチル基も一部含む) に対応する  $m/z$  85、 $m/z$  57 を持つ (Fig.4)。このフラグメントパターンは、同じ中性アミノ酸であるグリシン、 $\alpha$ -アラニン、 $\beta$ -アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンや酸性ヒドロキシアミノ酸であるトレオニンやセリン、イミノ酸のプロリンやサルコシンにも共通している (Fig.5)。



**Fig.3.** Total ion chromatograms (TIC) of amino acid as pivaloyl/*S*-(+)-2-butyl esters from bacterial peptidoglycan tissues in (a) *Staphylococcus staphylolyticus* and (b) *Enterococcus faecalis* (cf. separation by DB-23 column as shown in Appendix). Abbreviations with the D-, L- forms: Alanine, Ala; Glycine, Gly; Valine, Val; Leucine, Leu; Isoleucine, Ile; Proline, Pro; Threonine, Thr; Serine, Ser; Methionine, Met; Aspartic acid, Asp; Phenylalanine, Phe; Glutamic acid, Glu; Lysine, Lys; Tyrosine, Tyr.

グルタミン酸（酸性アミノ酸：分子内にカルボキシル基2つ、アミノ基1つを保有）のマススペクトルは、 $[M]^+$ が343であり、 $[M-73]^+$ 、 $[M-101]^+$ 、に対応する  $m/z$  270,  $m/z$  242, 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。このフラグメントパターンは、同じ酸性アミノ酸であるアスパラギン酸にも共通している。

フェニルアラニン（芳香族アミノ酸）のマススペクトルは、 $[M]^+$ が305であり、 $[M-73]^+$ 、 $[M-101]^+$ 、に対応する  $m/z$  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。このフラグメントパターンは、同じ芳香族アミノ酸であるチロシンにも共通している。いずれのアミノ酸誘導体にも、親イオン  $[M]^+$ に加え、いくつかの規則的なフラグメントパターンがあることが分かる。

非タンパク性アミノ酸には、これ以外にも構造異性体（高野ら, 2015）は多く存在することから、

標準物質の保持時間の情報を併せて比較する必要がある。Table 1 に、各アミノ酸のピバロイル/イソブチルエステル誘導体の保持時間およびマススペクトルをまとめた。

#### 4.2. 本分析法の生物地球化学試料への応用例

バクテリア由来 (*Staphylococcus staphylolyticus*, *Enterococcus faecalis*) のペプチドグリカン組織の他、陸水性および海洋性の甲殻類、相模湾深海底湾中部で採取されたハオリムシ（チューブワーム）の外殻部（尻尾）の分析結果を Fig. 6 に示す。いずれの試料もイオン交換グラフィーによるアミノ酸精製を行ったため、マトリックスが除去され、D-アミノ酸が明瞭に検出されている。ペプチドグリカンに関する諸性状、細胞壁あたりの含有量に関する知見は、既報に詳しく述べられている（例えば、Wientjes et al., 1991; Park and Uehara, 2008）。

大西洋中央海嶺より採取された蛇紋岩試料から

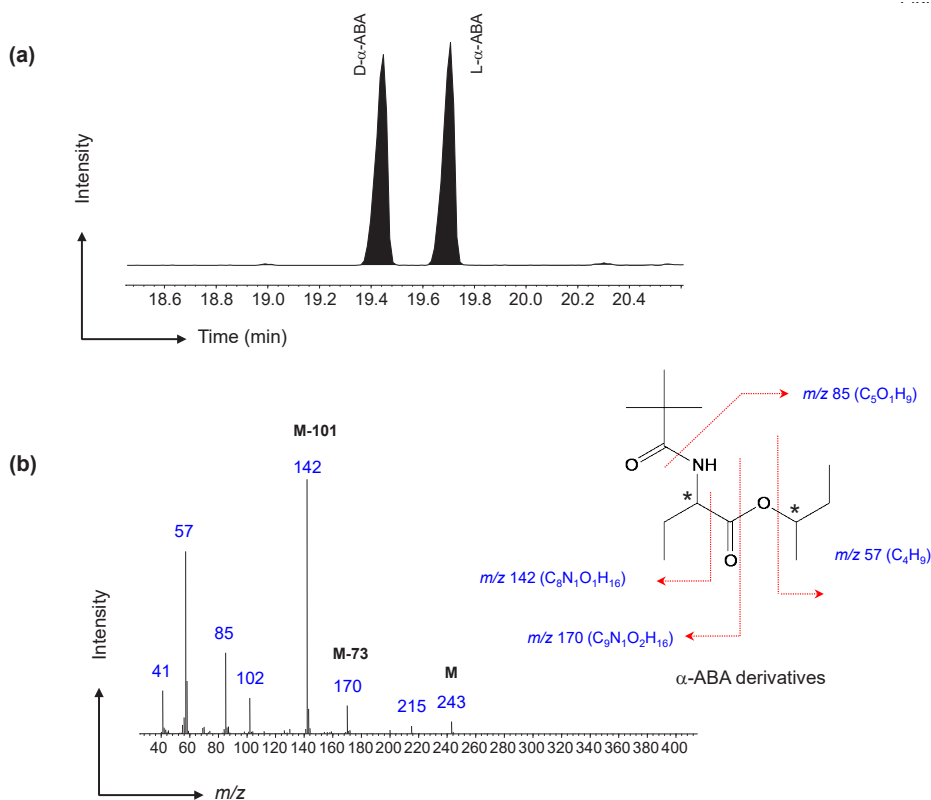


Fig. 4. (a) GC separation of D- and L-  $\alpha$ -aminobutyric acid (D-, L- $\alpha$ -ABA) and (b) mass spectra pattern as pivaloyl/ *S*-(+)-2-butyl ester derivative. The mass fragmentation of  $[M-101]^+$ ,  $[M-73]^+$ , ions from pivaloyl  $[85]^+$  and 2-butyl  $[57]^+$  are shown.

Fig.5. (a) (1/4)

(a) Protein AAs

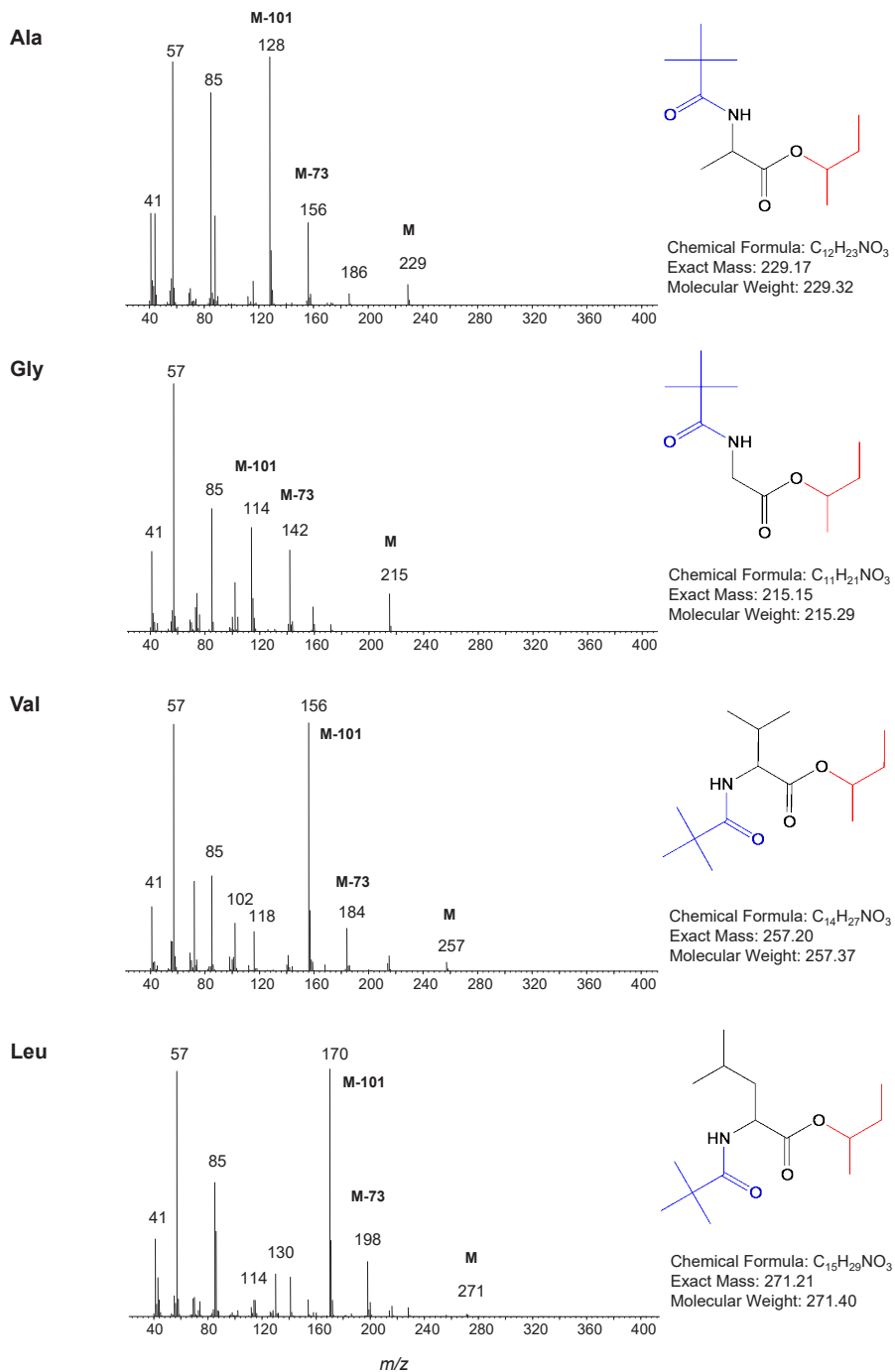


Fig.5. Mass spectra of amino acids as pivaloyl/ *S*-(+)-2-butyl ester derivatives with the note of molecular structure, chemical formula, exact mass, and molecular weight.

Fig. 5. (a) (2/4)

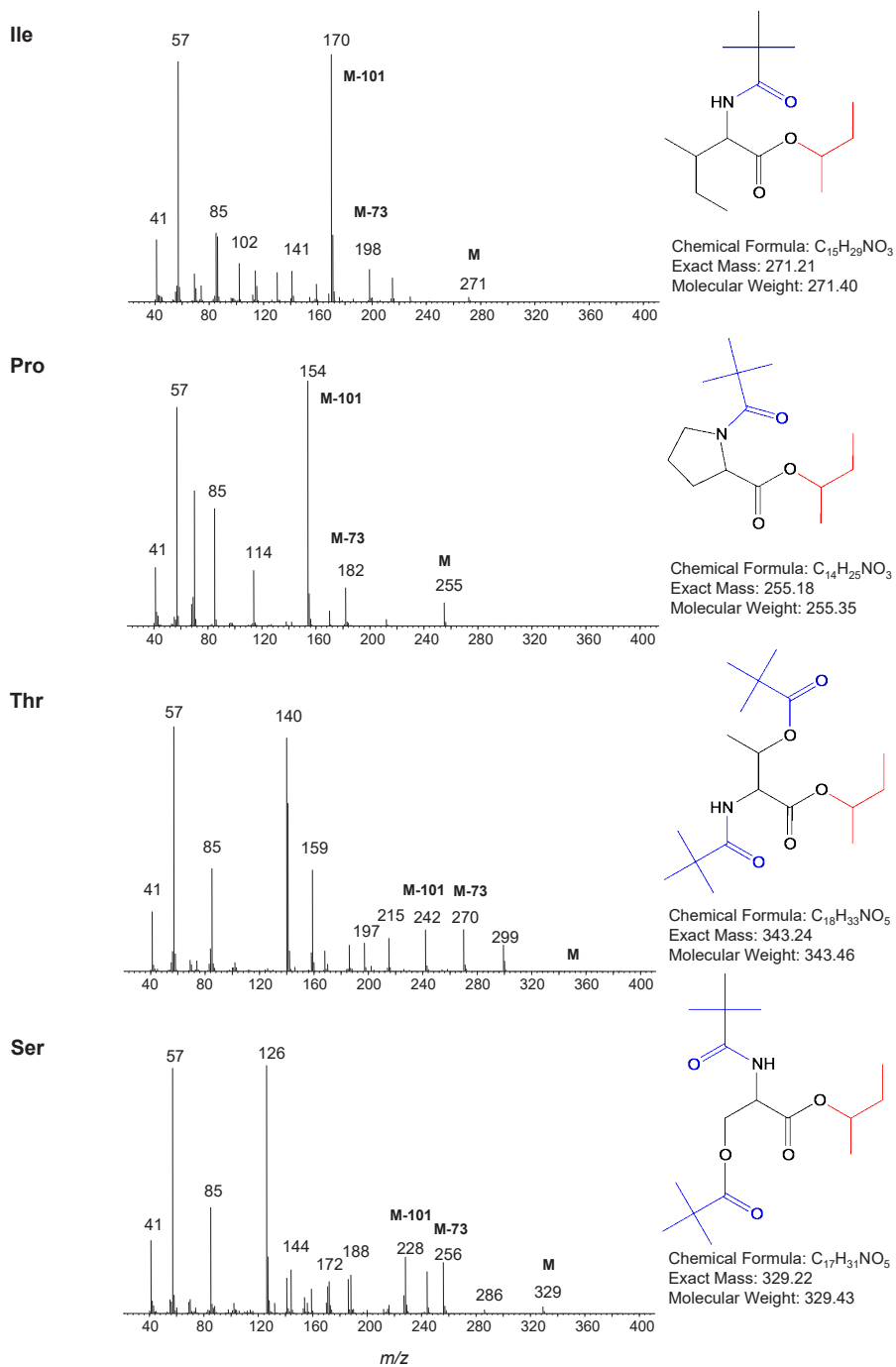




Fig. 5. (a) (3/4)

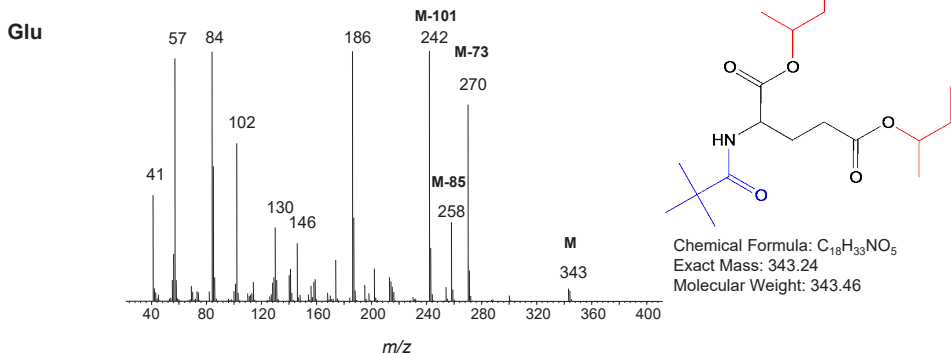
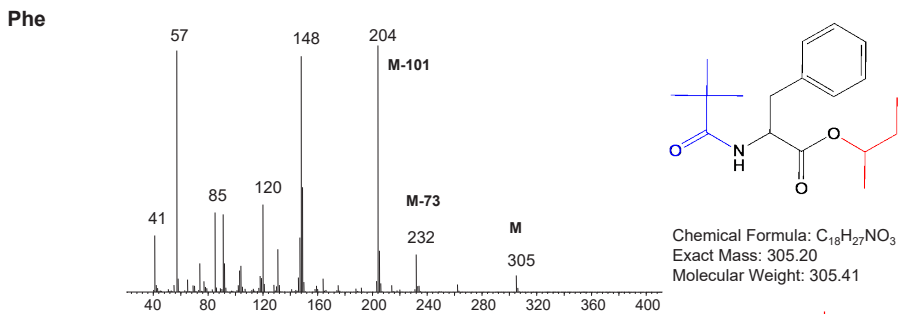
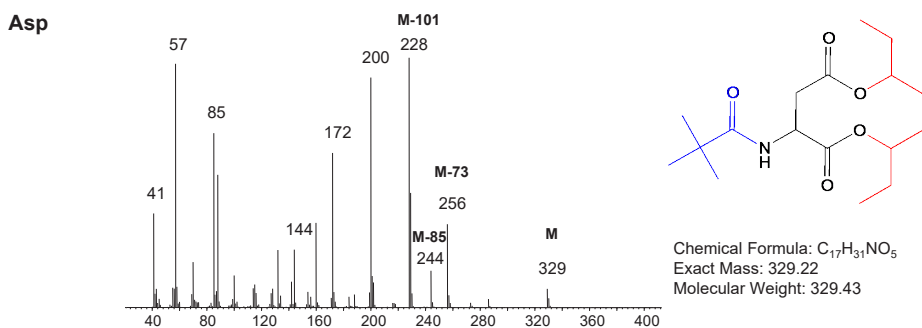
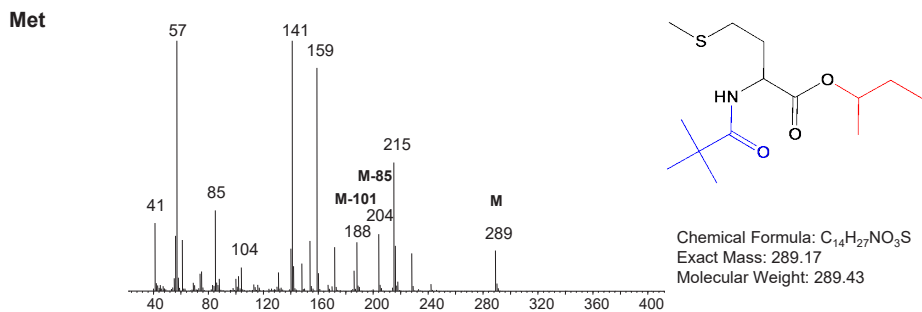


Fig. 5. (a) (4/4)

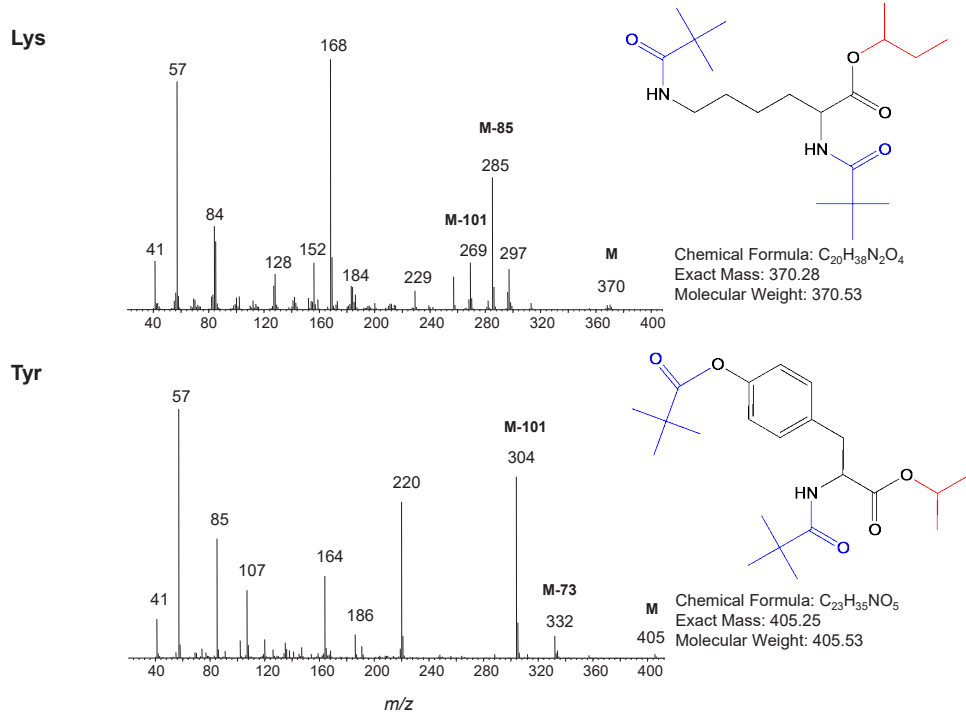
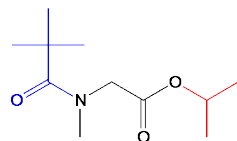
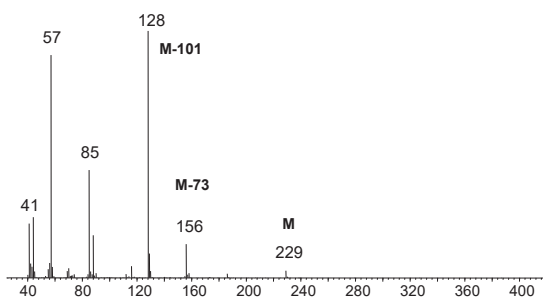


Fig.5. (b) (1/2)

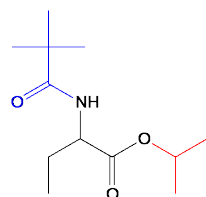
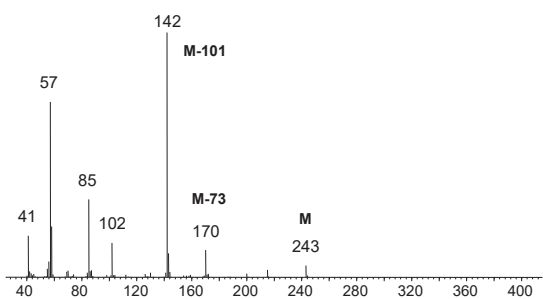
(b) Non-protein AAs

Sar



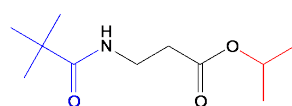
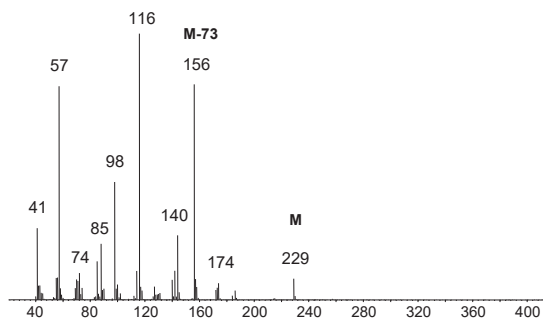
Chemical Formula:  $C_{12}H_{23}NO_3$   
 Exact Mass: 229.17  
 Molecular Weight: 229.32

$\alpha$ -ABA



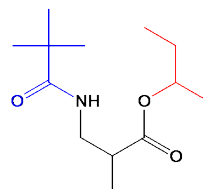
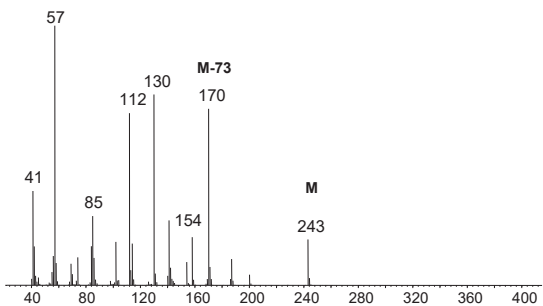
Chemical Formula:  $C_{13}H_{25}NO_3$   
 Exact Mass: 243.18  
 Molecular Weight: 243.34

$\beta$ -Ala



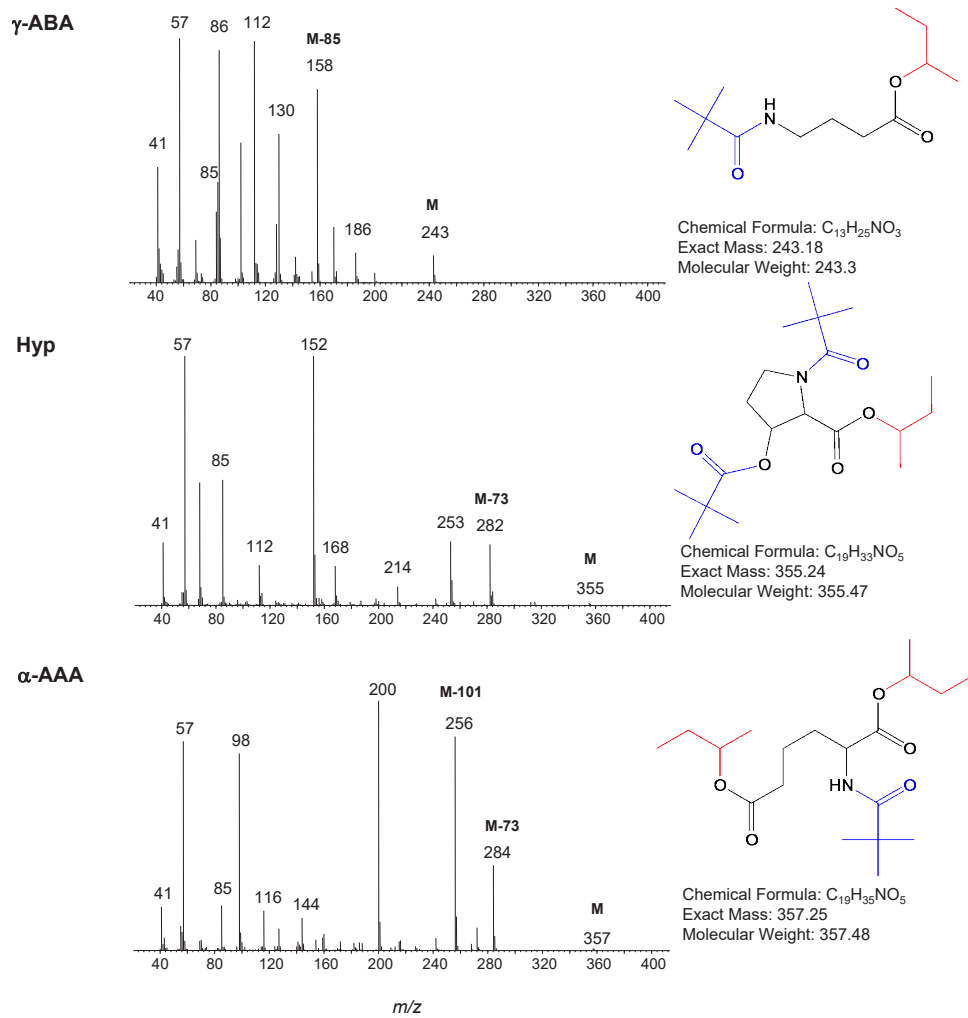
Chemical Formula:  $C_{12}H_{23}NO_3$   
 Exact Mass: 229.17  
 Molecular Weight: 229.3

$\beta$ -AiBA



Chemical Formula:  $C_{13}H_{25}NO_3$   
 Exact Mass: 243.18  
 Molecular Weight: 243.34

Fig. 5. (a) (2/2)



**Table 1.** Summary of retention time and prominent fragment ions for pivaloyl/ *S*(+)-2-butyl esters of L-amino acid. All compounds are identified by GC retention time and mass spectra with those of standards.

Elution order	Abbreviation	Formula	Molecular weight		Retention time (min)	Product ions ( <i>m/z</i> )
			Underivatives	Derivatives		
<b>Protein type</b>						
L-Alanine	Ala	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	89	229	18.1	156, 128, 85, 57
Glycine	Gly	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75	215	18.7	143, 114, 85, 57
L-Valine	Val	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	117	257	20.6	184, 156, 85, 57
L-Leucine	Leu	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131	271	21.9	198, 170, 85, 57
L-Isoleucine	Ile	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131	271	22.4	198, 170, 85, 57
L-Proline	Pro	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	115	255	24.4	182, 154, 85, 57
L-Threonine	Thr	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	119	343	26.5	270, 242, 85, 57
L-Serine	Ser	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	105	329	27.1	256, 228, 85, 57
L-Methionine	Met	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	149	289	27.4	204, 188, 85, 57
L-Aspartic acid	Asp	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	133	329	28.2	256, 228, 85, 57
L-Phenylalanine	Phe	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	165	305	29.7	232, 204, 85, 57
L-Glutamic acid	Glu	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	147	343	30.7	270, 242, 85, 57
L-Lysine	Lys	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	146	370	37.4	285, 269, 57
L-Tyrosine	Tyr	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	181	405	39.4	332, 304, 85, 57
<b>Non-protein type</b>						
Sarcosine	Sar	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	89	229	17.8	156, 128
L- $\alpha$ -Aminobutyric acid	$\alpha$ -ABA	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	103	243	19.7	170, 142, 85, 57
$\beta$ -Alanine	$\beta$ -Ala	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	89	229	20.2	156, 57
L- $\beta$ -Aminoisobutyric acid	$\beta$ -AiBA	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	103	243	20.8	170, 85, 57
$\gamma$ -Aminobutyric acid	$\gamma$ -ABA	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	103	243	23.4	158, 57
L-Hydroxyproline	Hyp	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	131	355	31.8	282, 85, 57
L- $\alpha$ -Aminoadipic acid	$\alpha$ -AAA	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>	161	357	32.4	284, 256, 85, 57

Crustacea in terrestrial environment

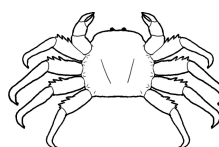
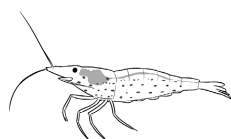
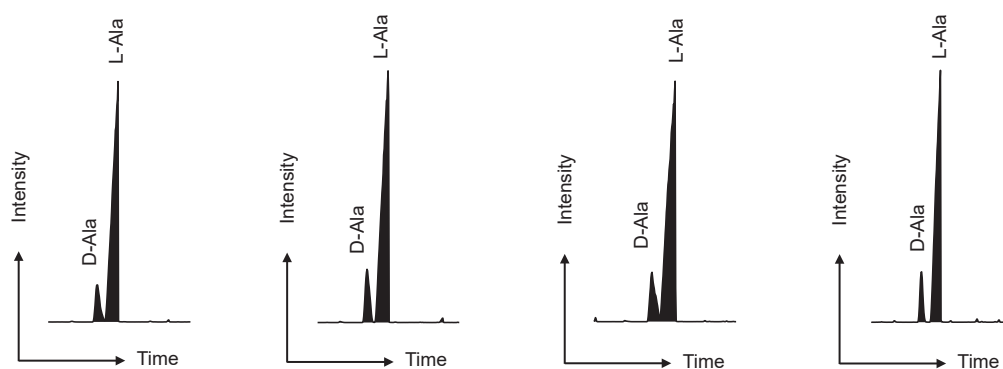
Crustacea & Polychaeta in marine environment

(a) *Caridina multidentata*

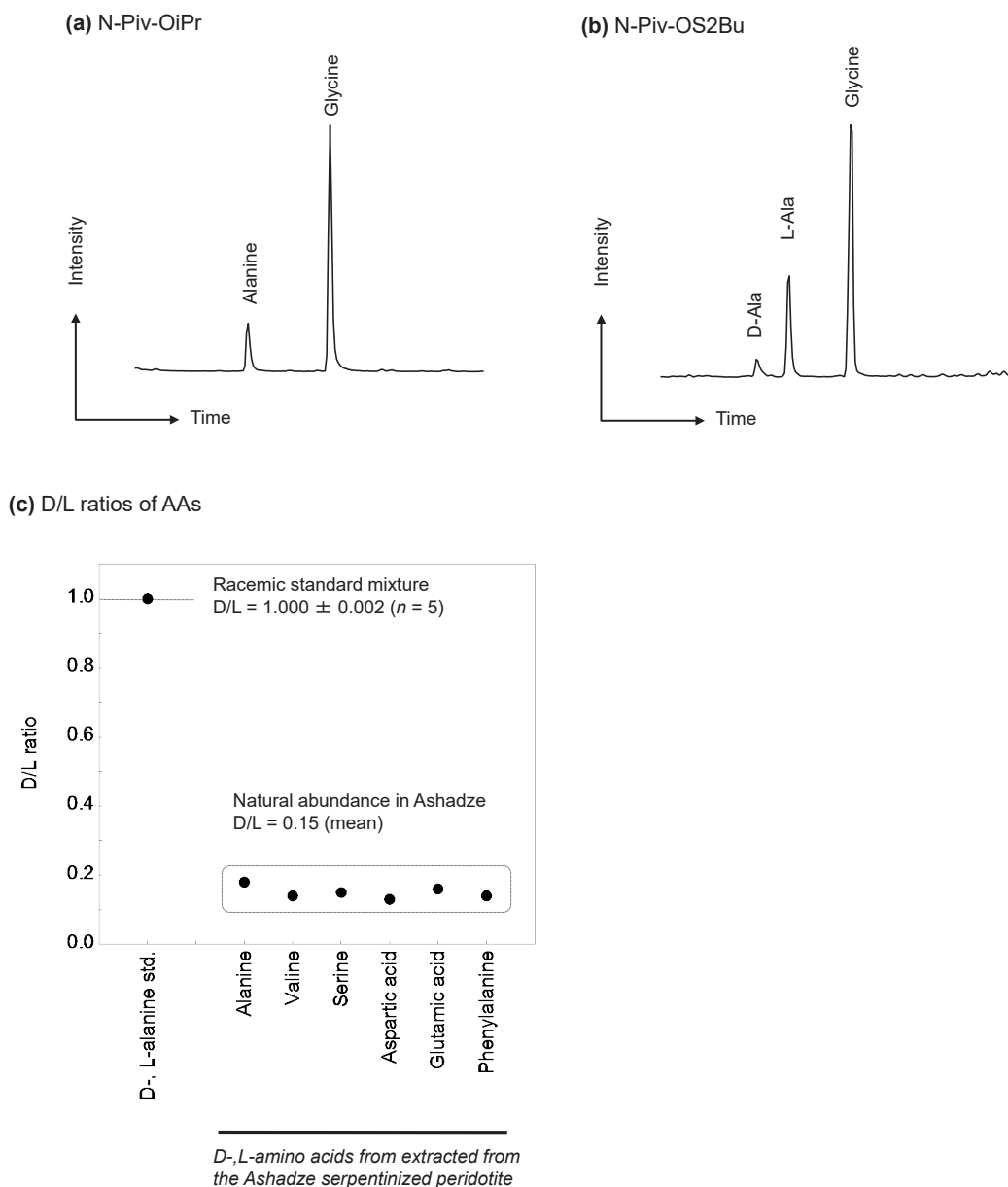
(b) *Penaeus monodon*

(c) *Plagusia dentipes*

(d) *Lamellibrachia*



**Fig. 6.** Separation of D-alanine and L-alanine (EIC, *m/z* 128) in biological hard-tissue samples from terrestrial fresh-water environments for (a) Atyidae; *Caridina multidentata*, (b) Black tiger prawn; *Penaeus monodon*, and marine environments (c) Grapsoidae; *Plagusia dentipes*, (d) Tubeworm; *Lamellibrachia*.



**Fig. 7.** (a) Separation of alanine and glycine by N-Pivaloyl isopropylesters and (b) D-alanine, L-alanine and glycine by N-Pivaloyl S-(+)-2-butyl esters in the deep-sea serpentine sample at Atlantic ocean (cf. Bassez et al., 2009). (c) D/L amino acid ratios in the analysed Ashadze peridotite rock with the comparison of racemic  $\alpha$ -alanine standard (Bassez et al., 2009).

抽出したアミノ酸のピバロイル/イソプロピルエステル誘導体のクロマトグラムとピバロイル/S-(+)-イソブチルエステル誘導体のクロマトグラムを示す (Fig. 7)。イソプロパノールを用いてエステル化を行った場合、D-アミノ酸とL-アミノ酸は光学分割されず、一つのシグナルとして検出される。

蛇紋岩試料から抽出したアラニン、バリン、セリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニンのD/L比を Fig. 7-c に示した (Bassez et al., 2009)。地球化学的な試料の場合、試料の前処理で生じた沈殿物の除去や誘導体化を阻害するマトリクスを除去することは、ベースライン分離を行う

上で重要な手順である (Fig. 1)。

アミノ酸のピバロイル/イソプロピルエステル誘導体のマススペクトル (力石ら, 2009) を併せて参照されたい。目的に応じて, エステル化試薬を使い分けるだけで, 様々な試料 (例えば, Bassez et al., 2009; Chan et al., 2016) に対し, このような分離結果を得ることが可能である。本稿で示した微極性カラムでの分離の他, 中極性・高極性のキャピラリーカラムでの分離も検証されている (Chikaraishi et al, 2010: Appendix)。さらに, ガスクロマトグラフィーによるベースライン分離ができない場合は, 液体クロマトグラフィー/ガスクロマトグラフィー (LC x GC 法, もしくは, LC-GC 法: Takano et al., 2015) や 2 次元ガスクロマトグラフィー (2D-GC: 例えば, Meinert and Meierhenrich, 2012) 等を組み合わせて適用することも有効である。

## 謝 辞

大西洋中央海嶺の蛇紋岩試料は, M-P. Bassez 教授 (Univ. Strasbourg) と A. Delacour 准教授 (Univ. Jean Monnet, Saint-Etienne) から提供されたものである。相模湾から採取されたチューブワーム試料は, 山口保彦博士 (東京大学), 藤倉克則博士 (JAMSTEC) より提供されたものである。後藤晶子氏 (金沢大学) と 1 名の匿名査読者には, 本稿の査読を行って頂き, 有益なコメントを頂いた。本研究の一部は, 文部科学省 (MEXT) の科学研究費補助金・新学術領域研究 (No. 25108006; Y.T.) および科学技術振興機構 (JST) の戦略的創造研究推進事業 (CREST; N.O., Y.C.) によって行われた。

## 引用文献

Abelson, P. (1954) Organic constituents of fossils: Carnegie Inst. Washington Yearbook **53**, 97-101.  
 Abelson, P. and Hoering, T. (1961) Carbon isotope fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms. *PNAS* **47**, 623-632.  
 Bassez, M.-P., Takano, Y. and Ohkouchi, N. (2009) Organic analysis of peridotite rocks from the Ashadze and Logatchev hydrothermal sites. *Int. J.*

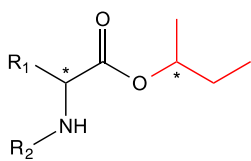
*Mol. Sci.* **10**, 2986-2998.  
 Chan, Q., Chikaraishi, Y., Takano, Y., Ogawa, N. O. and Ohkouchi, N. (2016) Amino acid compositions in heated carbonaceous chondrites and their compound-specific nitrogen isotopic ratios. *Earth, Planets Space* **68**: 7. doi:10.1186/s40623-40016-40382-40628.  
 Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O. 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, N.O. and Ohkouchi, N. (2010) Instrumental optimization for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. In *Earth, Life and Isotopes (Edited by Ohkouchi N., Tayaasu I. and Koba K.)*, Kyoto Univ. Press, pp. 367-386.  
 Chikaraishi, Y., Steffan, S.A., Ogawa, N.O., Ishikawa, N.F., Sasaki, Y., Tsuchiya, M. and Ohkouchi, N. (2014) High-resolution food webs based on nitrogen isotopic composition of amino acids. *Ecol. Evol.* **4**, 2423-2449.  
 Chikaraishi, Y., Steffan, S., Takano, Y. and Ohkouchi, N. (2015) Diet quality influences isotopic discrimination among amino acids in an aquatic vertebrate. *Ecol. Evol.* **5**, 2048-2059.  
 力石 嘉人, 高野 淑識, 大河内 直彦 (2009) アミノ酸 (N-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. *Res. Org. Geochem.* **25**, 61-70.  
 Cronin, J. and Chang, S. (1993) Organic matter in meteorites: molecular and isotopic analyses of the Murchison meteorite. In *The chemistry of life's origins*. Kluwer Academic Publishers (Eds. J. M. Greenberg et al.), pp. 209-258.  
 GilAv, E., Feibush, B. and Charless, R. (1966) Separation of enantiomers by gas liquid chromatography with an optically active stationary phase. *Tetrahedron Lett.* **7**, 1009-1015.  
 Ehrenfreund, P. and Charnley, S.B. (2000) Organic

- molecules in the interstellar medium, comets, and meteorites: A voyage from dark clouds to the early Earth. *Ann. Rev. Astron. Astrophys.* **38**, 427-483.
- 藤倉 克則, 丸山 正, 奥谷 喬司 (2008) 潜水調査船が観た深海生物—深海生物研究の現在. 東海大学出版会.
- Goodfriend, A. G., Collins, J. M., Fogel, L. M., Macko, A. S. and Wehmiller, J. F. (2000) *Perspectives in Amino acid and Protein Geochemistry*, Oxford University Press.
- Kaiser, K. and Benner, R. (2005) Hydrolysis-induced racemization of amino acids. *Limnol. Oceanogr.: Methods* **3**, 318-325.
- Kvenvolden, K.A., Lawless, J.G., Pering, K., Peterson, E., Flores, J., Ponnampuruma, C., Kaplan, I.R. and Moore, C.B. (1970) Evidence for extraterrestrial amino-acids and hydrocarbons in the Murchison meteorite. *Nature* **228**, 923-926.
- 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.
- Meierhenrich, U. (2008) *Amino Acids and the Asymmetry of Life*. Springer.
- Meier-Augenstein, W. (2004) *Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques*. I, Chapter 8, Elsevier, The Netherlands.
- Meinert, C. and Meierhenrich, U. J. (2012). A New Dimension in Separation Science: Comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Angew. Chem. Int. Edit.* **51**, 10460-10470.
- 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 acid esters to measure  $^{15}\text{N}$  isotopic abundances in physiological samples: A pilot study on amino acid synthesis in the upper gastro-intestinal tract of minipigs. *J. Mass Spectrom.* **31**, 367-376.
- Michener, R. and Lajtha K. (2007) *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Publishing.
- Montigon, F., Boza, J.J. and Fay, L.B. (2001) Determination of C-13- and N-15-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 Comm. Mass Spectrom.* **15**, 116-123.
- Stolting, K. and Konig, W.A. (1976) Mechanism of separation of amino-acid enantiomers by gas-chromatography. *Chromatogr.* **9**, 331-332.
- Takano, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Kitazato, H. and Ohkouchi, N. (2009) Compound-specific nitrogen isotope analysis of D-, L-alanine and valine: application of diastereomer separation to  $\text{d}^{15}\text{N}$  and microbial peptidoglycan studies. *Anal. Chem.* **81**, 394-399.
- Takano, Y., Kashiyama, Y., Ogawa, N. O., Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2010a) Isolation and desalting with cation-exchange chromatography for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **24**, 2317-2323.
- Takano, Y., Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2010b) Enantiomer-specific isotope analysis (ESIA) of D- and L-alanine: nitrogen isotopic hetero- and homogeneity by microbial and chemical processes. In *Earth, Life and Isotopes (Edited by Ohkouchi N., Tayasu I. and Koba K.)*, Kyoto Univ Press, pp. 387-402.
- 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.
- 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マスペクトル解析. *Res. Org. Geochem.* **31**, 33-49.
- 土屋 正彦, 松比良 伸也, 鎌田 仁 (1965) 質量分析による有機化合物の構造解析法の研究. *分析化学*, **14**, 465-472.
- Ohkouchi, N., Tayasu, I. and Koba, K. (2010) *Earth*,

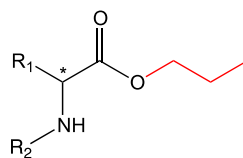


- Life, and Isotopes*. Kyoto Univ. Press.
- Ohkouchi, N. and Takano, Y. (2014) Organic nitrogen: sources, fates, and chemistry. In *Treatise on Geochemistry 12 (10: Organic Geochemistry: Eds. Birrer, B., Falkowski, P., Freeman, K.)*, **12**, pp. 251-289.
- Park, J.T. and Uehara, T. (2008) How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 211-227.
- Palyi, G., Zucci, C. and Caglioti, L. (1999) *Advances in Biochirality*, Elsevier Science.
- Pelz, O., Cifuentes, L.A., Hammer, B.T., Kelley, C.A. and Coffin, R.B. (1998) Tracing the assimilation of organic compounds using delta C-13 analysis of unique amino acids in the bacterial peptidoglycan cell wall. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**, 229-240.
- Wientjes, F.B., Woldringh, C. and Nanninga, N. (1991) Amount of peptidoglycan in cell walls of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **173**, 7684.

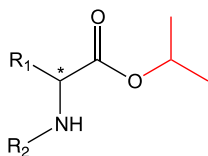
**Abbreviations:** GC/MS, Gas Chromatography/Mass Spectrometry; PTV, Programmable Temperature Vaporization; EI, Electron Impact; NIST, National Institute of Standards and Technology; TFA, trifluoroacetyl; EtOC, ethoxycarbonyl ethyl esters; BDMS, butyldimethylsilyl; PFA, Pentafluoroacetyl; TIC, Total Ion Chromatogram; EIC, Extracted Ion Chromatogram; FID; Flame ionization detector; NPD, Nitrogen-phosphorus detector; IRMS, Isotope ratio mass spectrometer.



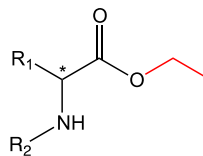
Isobutyl ester



*n*-propyl ester



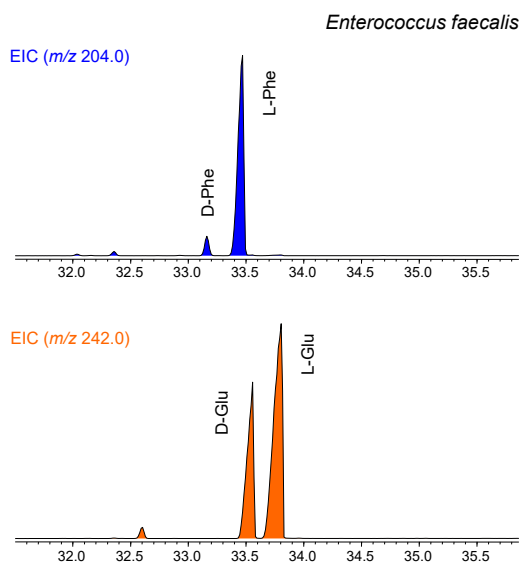
Isopropyl ester



ethyl ester

\* *chiral center*

**Appendix 1.** Representative esterification of carboxylic group in amino acids



**Appendix 2.** Separation of D-, L-Glu and D-, L-Phe by DB-23 (30 m x 0.32 mm i.d., 0.25  $\mu$ m, Agilent Technologies).