講座

ライフサイエンスのための安定同位体利用技術(Ⅲ)

 ^{15}N 標識アミノ酸のガスクロマトグラフィー質量分析法[†]

寒 川 喜三郎

大阪府立大学農学部

591 堺市百舌鳥梅町4-408

Key Words: nitrogen-15, amino acid, gaschromatography, mass spectrometer

1. 緒 言

生体構成成分として重要な含窒素化合物であるアミノ酸については、古くから微生物、動物、植物学などの各方面において、放射性同位体を用いた研究が多数行われている。窒素は最も寿命の長い放射性同位体の ^{15}N でも、その半減期は9.96分と短い¹⁾ので限られた場合にしか用いられない²⁾。それゆえ ^{14}C 、 ^3H で標識したアミノ酸の変化を追跡して、その代謝過程を推論することが多かった。しかし、アミノ酸は、生体内できわめて動的な状態にあるので、 ^{14}C 、 ^3H で標識した化合物を用いて得た知見からアミノ基窒素の直接の挙動を考えることは困難である。アミノ酸のアミノ基窒素の挙動を捉えるのには、安定同位体である重窒素(^{15}N)を使用することが必要である。

重窒素の分析は質量分析法(MS)、また発光分光法により測定されてきた^{3),4)}。アミノ酸の ^{15}N 存在率を測定する場合には、いずれの分析法もアミノ酸を分解し、ガス化処理したのち窒素ガスを分析することによって、その ^{15}N 存在率を測定している。したがって生体中のアミノ酸を測定する場合には、イオン交換樹脂分別、ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーなどの方法で分別し、単離したアミノ酸を分解し、ガス化したのち測定しなければならない^{5),6)}。そのため、アミノ酸の ^{15}N 存在率の測定には繁雑で高度な技術が要求される。

一方、近年分離能の優れたガスクロマトグラフと情報量の多く得られる質量分析計の結合したガスクロマトグラフィー質量分析法(GC-MS)が開発され、薬物代謝、生体物質の解明にさかんに用いられるようになってきた⁷⁾。 ^2H 、 ^{13}C 化合物の分析にGC-MSがよく用いられているのにもかかわらず、アミノ酸の ^{15}N 存在率測定にGC-MSを用いて詳細に検討した例はない。アミノ酸の ^{15}N 存在率がアミノ酸混合物について、それぞれのアミノ酸に事前に単離することなく、しかも微量のサンプルでも精度よく測定し得ることになれば、生物学、薬学、医学などにおけるアミノ酸代謝研究に大きく貢献するものと考えられる。

2. アミノ酸の ^{15}N 存在率測定へのGC-MSの導入⁸⁾

アミノ酸は不揮発性の化合物であるので、ガスクロマトグラフィーを行うのには、揮発性の誘導体に調製しなければならない。アミノ酸の分析には種々な誘導体(*N*-TFA エステル、*N*-チオカルボニル、*N*-アセチル、TMS エーテル、*N,N*-ジメチルエステル)が調製されてガスクロマトグラフィーに使用されているが、アミノ酸の ^{15}N 存在率の測定には、誘導体調製操作の難易、再現性、定量性、およびマスマスペクトルのフラグメンテーション(開裂)を考慮して選ばなければならない。

アミノ酸の誘導体化には Gehrke⁹⁾が確立した *N*-TFA(無水トリフルオロ酢酸)ブチルエステル誘導体法を用いた。この方法は誘導体調製には若干の手数を伴うが、定量性、マスマスペクトルの再現性の良好なこと、および ^{15}N を含んだマスマフラグメントイオン強度の強いこと¹⁰⁾などが、予備実験の結果、確認された。それが、この誘導体を選んだ理由である。

[†] Use of the Stable Isotopes in Life Science (Ⅲ) Measurement of ^{15}N Abundance in Amino Acids with Gaschromatography-Mass Spectrometry. Kisaburo SAMUKAWA: College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, 4-408, Mozuume-machi, Sakai-shi 591.

2・1 実験方法

標準アミノ酸試料として和光純薬製のアミノ酸アナライザ用試薬溶液（18種混合アミノ酸，H型，各アミノ酸 $2.5 \mu\text{M}/\text{ml}$ ）を用いた。

供試試料としてはカザミノ酸（メルク製，特級），ダイズの根（A：無窒素水耕液を用いバーミキュライト中で5週間生育させたダイズ，B：Aと同じ条件で4週間生育させたダイズに1週間，隔日更新で 50 ppm の $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含有させた水耕液を与えて栽培したダイズ）を用いた。

2・1・1 試料処理法

たとえばダイズでは，粉碎した根を Pirce 社(USA)のリアクチバイアルに秤量し 6N HCl を加えたのち窒素封入し，加水分解炉で 100°C ，24時間加水分解した。ついで Dowex $50\text{W} \times 8 (\text{H}^+ \text{型})$ にアミノ酸を吸着させ，蒸留水で洗浄後， 3N アンモニア溶液で溶出し，粗製アミノ酸試料液とした。

2・1・2 アミノ酸誘導体の作製

Gehrke⁹⁾の方法に準じて行った。すなわち試料の一定量を反応バイアルにとり，乾燥窒素ガスを通気して乾固，メタノール性塩化水素でエステル化したのち，ふたたび窒素ガスで溶媒を除去した。ついでブタノール性塩化水素を加えて 100°C で加温し，ブチルエステル化を行い，同じく窒素ガスで溶媒を除去した。ブチルエステル化したアミノ酸に，ジクロロメタンと TFA を加えて， 150°C で5分間加温して， $N\text{-TFA-O-}$ ブチルエステル誘導体を作製した。

GC-MS分析に使用した装置は，島津 LKB ガスクロマトグラフィー質量分析計（島津 LKB 9000）である。分析条件は表1に記載したとおりである。

表 1 GC-MS の分析条件

サンプル	$N\text{-TFA-O-}$ ブチルエステルアミノ酸
装置	GC-MS 島津 LKB 9000
カラム	液相：0.5% EGA，担体：Chromosorb W (AW 80~100 mesh)， ガラスカラム：2m×3mm (Packed)
カラム温度	$70 \sim 200^\circ\text{C}$ (昇温割合 $4^\circ\text{C}/\text{min}$)
注入口温度	250°C
セパレータ温度	300°C
イオン化電圧	20 eV
イオン源温度	270°C
イオン加速電圧	3.5 kV

2・2 結果および考察

図1に標準アミノ酸（18種混合）の TIM (total ion monitor) によるクロマトグラムを示した。これは flame ionization detector (FID) 型ガスクロマトグラフィーの記録に相当するものである。この結果は14種のアミノ酸が分離されていることを示している。図1中のオルニチンはアミノ酸定量用のために加えた内部標準である。アルギニン，トリプトファン，ヒスチジン，シスチンの TFA ブチルエステル誘導体は用いた EGA (ethylene glycol adipate polyester) 液相では定量的な溶出が行われないので，分析できなかった。TIM クロマトグラムの結果はガスクロマトグラフィーにかかった各アミノ酸の分離が良好なことを示した。これらのアミノ酸が完全に単離されていることは，それぞれの GC ピークの先端部に相当するマススペクトルの解析からも確認された。

図 1 標準混合アミノ酸の TIM クロマトグラム。

図 2 $N\text{-TFA}$ ブチルエステルアスパラギン酸のマススペクトル。

表2，図2には標準アミノ酸混合物とダイズの根からのアスパラギン酸のマススペクトル値とマススペクトルを表示した。

表2に示した標準アミノ酸のアスパラギン酸のマススペクトルの結果は， m/e 240 がイオン強度最大とな

表 2 GC-MS で分離した *N*-TFA ブチルエステ
ルアスパラギン酸のマスフラグメント

	ピーク No.	標準アミノ酸			ダイズ	
		<i>m/e</i>	I.I.	R.I.	I.I.	R.I.
$\text{CF}_3\text{CONH}=\text{CH}=\text{CH}$	1	139	8.3	44.9	8.2	41.4
	2	140	7.1	38.8	6.9	34.5
	3	142	2.0	10.9	1.9	9.6
$(\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9\text{COO}-\text{C}_4\text{H}_9)-\text{H}_2\text{O}$	4	166	4.4	23.6	4.1	20.3
	5	167	10.4	56.4	10.4	52.4
	6	168	1.1	6.1	1.1	5.4
$(\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9\text{COO})-\text{C}_4\text{H}_9$	7	183	1.3	7.3	1.1	5.7
	8	184	9.5	51.7	9.5	47.8
	9	185	3.9	21.1	3.9	19.5
$(\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9\text{O})-\text{C}_4\text{H}_9$	10	198	4.1	22.3	3.9	19.7
	11	211	2.2	11.7	2.2	10.9
	12	212	9.5	51.4	9.7	48.6
$\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9\text{COO}$	13	240	18.4	100.0	19.9	100.0
	14	241	5.7	31.0	6.3	31.7

I.I.: イオン強度, R.I.: 相対イオン強度

り, ついで *m/e* 167, 184, 212, 139 と多くのフラグメントイオンが出現している。そして, ダイズ (コントロール区) の根のアスパラギン酸のマスフラグメントイオンも標準アミノ酸のアスパラギン酸と完全に一致しており, 両者が同じアミノ酸であることがマスペクトルの結果からも同定できた。相対強度比はわず

かに相違しているが, これは磁場掃引の技術と関係がある誤差と考えられ, 本質的なものではないであろう。そしてまたアスパラギン酸の分子式から考えられた開裂図 (図 3) とよく一致していること, およびそれ以外のマスフラグメントイオンが認められないことから, ガスクロマトグラフィにより完全に単離されていることが確認できた。

^{15}N 存在率を測定する場合の条件として, ①窒素原子を含んだフラグメントイオンであること, ②相対強度が大きいこと, ③測定する質量数 (*m/e*, マスフラグメントイオン) がバックグラウンドの影響を受けないこと, ④測定する *m/e* が他のフラグメントの影響を受けないことが重要であると考えられる。それゆえ, イオン強度の大きい基準ピーク (ただし窒素原子を含んでいること), または分子イオンから COOC_4H_9 基の開裂した *m/e* 値 ($\text{M}-101$) を主として用いた。

表 3 に各種のアミノ酸についての同位体存在率測定結果を示した。コラムの第 2 欄には 3 種の試料 (試料中における ^{15}N 存在率は天然存在率 0.37 atom % のもの) のマスフラグメントのイオン強度比を示した。いずれもほぼ同一の値を示しており試料の違いによる差, また同一サンプルを日をおいて測定しても, 測定結果は変わらず測定的时间差に影響されないことが示された。

^{15}N 投与試料としてはダイズに ^{15}N 硫酸を与えて水耕

図 3 アスパラギン酸の開裂図 (フラグメンテーション)。

表 3 種々なサンプルアミノ酸のマスフラグメントの強度比

アミノ酸	測 定 値 $\left(\frac{n+1}{n} \times 100\right)$								$\Delta I_1 \times 100$ (B)-(A)	^{15}N Atom% excess
	m/e	SAA* (1)	SAA* (2)	カザミ ノ酸	ダイズ ^{a)} (1)	平均値 (A)	S.D.**	C.V.**	ダイズ ^{b)} (2) (B)	
アラニン	141/140	43.5	43.5	43.4	44.3	43.7	0.36	0.83	48.5	4.5
バリン	169/168	18.2	18.2	17.5	17.6	17.9	0.33	1.83	22.3	4.2
グリシン	128/127	5.9	4.8	5.7	5.0	5.4	0.46	8.62	9.0	3.4
イソロイシン	183/182	14.9	14.5	14.8	15.0	14.8	0.19	1.26	19.5	4.5
ロイシン	183/182	19.0	18.7	18.8	19.0	18.8	0.13	0.69	23.5	4.5
プロリン	167/166	9.4	8.5	11.9	9.1	9.7	1.30	13.34	12.4	2.6
スレオニン	154/153	7.2	7.3	7.2	7.3	7.3	0.05	0.69	10.7	3.3
セリン	140/139	7.8	7.2	6.8	6.8	7.2	0.41	5.72	10.8	3.4
メチオニン	228/227	11.6	11.0	11.8	11.2	11.4	0.32	2.77	Trace	—
アスパラギン酸	241/240	31.4	31.0	31.5	31.7	31.4	0.26	0.81	39.4	7.4
グルタミン酸	199/198	7.4	7.5	7.4	7.2	7.4	0.11	1.49	12.6	4.9
オルニチン	167/166	20.5	20.1	20.9	N.A.****	20.5	0.33	1.59	20.1	—
リジン	181/180	11.6	11.4	11.2	11.3	11.4	0.15	1.30	14.2	2.7

a) ダイズ(1): 無窒素水耕液を用いて生育させたダイズ

b) ダイズ(2): 7日間 ^{15}N 硫酸を投与したダイズ

* SAA: 標準混合アミノ酸, ** S.D.: 標準偏差, *** C.V.: 変異係数, **** N.A.: 無添加

栽培した試料を用いたが、 ^{15}N 処理ダイズ (ダイズ(2)) の根におけるマスフラグメントの強度比はいずれもコントロールのダイズ (ダイズ(1)) の根における値よりも高くなり、 ^{15}N 硫酸を吸収したことを示した。 ^{15}N 処理ダイズの根における ^{15}N 存在率の計算は Vanden Heuvel の式に準じて計算した (後述)¹¹⁾。ダイズの根における最も ^{15}N 存在率の高いアミノ酸はアスパラギン酸で、ついでグルタミン酸であった。このダイズは 7 日間 ^{15}N 硫酸を吸収させた植物体であるが、各種のアミノ酸への ^{15}N の取り込みは、同一比率ではなく差を生じること示した。

表 3 に示したアミノ酸の中でプロリン、グリシン、セリンなどの同位体存在率 (マスフラグメントのイオン強度比) は変動の大きいことが認められた。これは GC 溶出曲線の測定位置が最適でなかったことなどにより、バラツキを生じたのではないかと考えられた。

3. ^{15}N 標識アミノ酸の GC-MS による ^{15}N 存在率の測定¹²⁾

アミノ酸のガスクロマトグラフィによって得られるピークは正規分布をしており、しかも、溶出の初めから終わりまでの時間は比較的短い。それゆえマススペクトルを測定する GC ピークの位置が ^{15}N 存在率を測定する場合大きな影響をもつことになる。そこで、 ^{15}N

標識アスパラギン酸を標品として用い、GC-MS で測定する場合の種々な条件について検討を加えた。

3.1 実験方法

^{15}N 標識アミノ酸として 50 atom % excess ^{15}N アスパラギン酸 (光興業製) を用いた。また、対照の天然 ^{15}N 存在率のアミノ酸としては、和光純薬製の 18 種混合 (H 型, 2.5 $\mu\text{M}/\text{ml}$) アミノ酸標準溶液中のアスパラギン酸を用いた。アミノ酸は *N*-TFA ブチルエステル誘導体に調製した。GC-MS 分析に使用した装置は、日立ガスクロマトグラフィ-質量分析計 (RMU-6

表 4 GC-MS の分析条件

サンプル	<i>N</i> -TFA- <i>O</i> -ブチルエステルアミノ酸
装置	日立 GC-MS (RMU-6 MG)
カラム	液相: 0.5% EGA, 担体: Chromosorb W (AW 80~100 mesh), ガラスカラム: 1m×3mm (Packed)
カラム温度	70~200°C (昇温割合 3°C/min)
注入口温度	230°C
セパレータ温度	270°C
イオン化電圧	20 eV
イオン源温度	160°C
イオン加速電圧	3.2 kV

MG)である。使用条件は表4に示した。

^{15}N 存在率の算出には ^{13}C に用いられた Vanden Heuvel¹¹⁾の式

$$N_x = \frac{\Delta I_1 \times N_0^2}{100m + \Delta I_1 N_0}$$

N_x : ^{15}N 存在率 (atom % excess)

N_0 : ^{14}N の天然存在率 (99.63atom %)

m : フラグメント中の窒素の数 (例: 表3の場合: 1)

ΔI_1 : マスフラグメントの強度比の差 (例: 表3のアラニン: 0.048)

を適用した。この式の妥当性について、著者は ^{15}N 標識トリプトファン (92atom % excess ^{15}N , 成分保証値, 光興業製)および対照としてのトリプトファン(味の素製, 天然同位体存在率のもの)を用いて検討した。試料は直接試料導入法(DI)によりイオン化し, m/e 0~280の範囲をリピートスキニングすることによって測定した。得られたマススペクトルから ΔI_1 を計算し, Vanden Heuvelの式に代入して ^{15}N 存在率を算出した。本法で得られた結果は 92.1atom % excess の値を示した。これは保証成分値とよく一致しており, 本式を用いて, マススペクトル値から ^{15}N 存在率を算出できることを確認した¹³⁾。

3・2 結果および考察

3・2・1 アミノ酸のマススペクトル

図4にアスパラギン酸のマススペクトルを示した。(A)は天然同位体存在率のアスパラギン酸の結果を表し, (B)は ^{15}N で標識されたアスパラギン酸の結果を表している。このマススペクトルによって, アスパラギン酸が電子衝撃イオン化法(EI)により, フラグメンテーションされる様相を知ることができる。アスパラギン酸の m/e 240 マスフラグメントは $\text{CF}_3\text{CONHCH}-\text{CH}_2-\text{COOC}_4\text{H}_9$ で構成されており, マススペクトルに記録されている m/e 241 は, ^{13}C , ^2H , ^{17}O , ^{15}N など

図4 2種類のアスパラギン酸におけるマススペクトル。

図5 アスパラギン酸のGC-リピートスキニング MS 分析の TIM クロマトグラム。

の含有量によりマススペクトル強度が決まる。図4(B)に示すように ^{15}N 含有量が多いものは m/e 241 のピークが大きくなり, その強度は ^{15}N 含有量に比例する(図6参照)。

3・2・2 GC ピーク上の測定位置による ^{15}N 存在率の変動

GC からの溶出曲線は正規分布を示す。成分の溶出速度は, GC の正規分布曲線の頂上部に相当する時点で最大になり, 以後減少していく。マススペクトルを測定する場合, 設定する質量数の範囲によって磁場掃引に要する時間は異なってくる。それゆえ, 溶出イオン量が急激に増大しているところで, m/e 値設定範囲が広くとられるほど m/e 値の大きいところで相対的に大きい強度を示す傾向をもつであろう。反対に, GC 溶出曲線の下降時には, マススペクトルの m/e 値の大きいところでは小さい相対強度を示すことになる。

そこで, ^{15}N 標識アスパラギン酸を使用して GC 溶出の初めから溶出終了までの間の ^{15}N 存在率の変動を測定した。測定位置は図5に, 結果は表5に示した。測定結果は, 溶出曲線の上昇時に, やはり n 値より n

表 5 50 atom % excess ^{15}N アスパラギン酸の N -TFA ブチルエステル誘導体の GC-リピート スキャン MS 分析から得られた ^{15}N 存在率

測定位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
^{15}N atom % excess	53.3	50.9	50.8	50.5	50.2	50.2	50.2	50.0	49.6	49.5	49.6	49.1

図 6 種々な ^{15}N 濃度のアスパラギン酸における ^{15}N 同位体存在率。

+1 値の強度が強いため、 ^{15}N 存在率の値は高くなっているが、最大溶出曲線値になる前から直後にかけてはまったく同一の値を示し、その後、溶出曲線の下降が急激になった時点の測定では、低い ^{15}N 存在率を示した。それゆえ、GC 溶出曲線の尖端部においてマススペクトルを測定すれば、正しい同位体存在率が得られることが分かった。

図 7 プロリン、スレオニンと混合試料のマススペクトル。

3.2.3 微量サンプルによる ^{15}N 存在率の測定

アスパラギン酸の GC-MS への試料注入量 (N -TFA ブチルエステルアスパラギン酸, 50 atom % excess ^{15}N) を $10^{-8} \sim 10^{-10}$ g の範囲で検討を行い、表 6 にその結果を示した。測定値は分光法の 1/500 量になっても、ほぼ同一の値を示した¹⁴⁾。GC-MS での感度は pg オーダーでも測定可能とされているので¹⁵⁾、実測値よりもさらに微量でも測定は可能と考えられる。しかし、ここでの値は GC-MS への注入量であるから、試料調製時にはこれより多量の試料が必要であることはいうまでもない。

表 6 アスパラギン酸 (50 atom % excess ^{15}N) の分析量と ^{15}N 存在率

希釈倍率	1	$\times \frac{1}{10}$	$\times \frac{1}{100}$
分析室素量 $\times 10^{-9}$ g	35	3.5	0.35
測定値 (^{15}N atom % excess)	50.2	50.1	50.1

3.2.4 ^{15}N 存在率の異なるアスパラギン酸試料における GC-MS 分析の信頼度

^{15}N 含有率の異なるアスパラギン酸溶液を調製し、 N -TFA ブチルエステル誘導体を作成して、GC-MS で ^{15}N 存在率を測定した。結果は、図 6 に示したように良好な直線関係を示した。GC-MS での測定は、GC のアスパラギン酸ピークの頂上部で m/e 235~245 の範囲をリピートスキャンングすることで測定した。実際に必要な m/e 値は 240 と 241 の強度であるが、リピート測定をする場合には、ある一定範囲の m/e 値幅をとることが機器の電子回路上必要であった。通常は $m/e \pm 5$ (アスパラギン酸の場合は $A=240$) でリピートスキャンングすることができた。

3.2.5 標準アミノ酸 (天然 ^{15}N 存在率) 混合物の GC-MS による同位体存在率の測定

前述の Vanden Heuvel の式を用いて ^{15}N 存在率を計算するさいには ΔI_1 を測

表 7 標準アミノ酸の *N*-TFA ブチルエステル誘導体のマスフラグメントの強度比

アミノ酸	<i>m/e</i>	測定値 ((<i>n</i> +1/ <i>n</i>)×100)					平均値	S.D.	C.V.
		1	2	3	4	5			
アラニン	141/140	47.9	46.9	47.8	47.0	47.1	47.3	0.42	0.89
バリン	169/168	17.6	18.4	18.6	18.7	18.5	18.4	0.39	2.14
グリシン	128/127	3.2	3.1	2.9	2.8	3.1	3.0	0.15	4.87
イソロイシン	183/182	15.7	15.9	16.1	15.8	15.5	15.8	0.20	1.27
ロイシン	183/182	19.9	20.6	20.3	20.2	20.7	20.3	0.29	1.41
プロリン	167/166	8.4	8.8	8.4	8.4	8.6	8.5	0.16	1.88
スレオニン	154/153	6.8	7.0	7.1	6.9	6.9	6.9	0.10	1.47
セリン	140/139	6.8	7.0	7.0	6.9	6.9	6.9	0.08	1.08
メチオニン	228/227	11.9	11.9	11.7	12.1	12.3	12.0	0.20	1.70
フェニールアラニン	217/216	12.7	12.6	12.6	12.4	12.5	12.6	0.10	0.81
アスパラギン酸	241/240	37.3	38.7	37.6	37.6	37.1	37.7	0.55	1.47
グルタミン酸	255/254	14.5	14.8	14.9	14.6	14.8	14.7	0.15	1.00
リジン	181/180	11.5	11.9	11.7	11.5	11.8	11.7	0.16	1.37

定しなければならない。 ΔI_1 は ^{15}N 標識物で増加した強度比から標準アミノ酸（天然 ^{15}N 存在率）の強度比を差し引いたものであるから、標準アミノ酸の強度比の再現性が問題となる。そこで、標準アミノ酸混合物を用いて *N*-TFA-*O*-ブチルエステル誘導体を調製し、その調製溶液のままGC-MSに注入し、TIMピークの頂上部付近で、それぞれのアミノ酸フラグメントの *m/e* 値に磁場を調節してリピート測定を行った。表7にそれぞれのアミノ酸の強度比の結果を示した。結果は、グリシンを除いてC.V. が約1～2%の範囲に入っており、再現性が良好であることを示した。グリシンの変異係数は大きかったが、これは強度比が最小のアミノ酸であり、スペクトルの読み取り誤差およびカラム液相のEGAによるバックグラウンド *m/e* 128 が影響を及ぼしているであろう。

また、分析試料中に含有量の大きいアミノ酸が存在した場合、続いて溶出するアミノ酸は測定し得ないことがGC分析の場合には起こり得る。たとえば、プロリンなどが多量に存在した場合、スレオニンはプロリンのGCピークのすそに隠れて分からないときがある。しかし、 ^{15}N 存在率測定の際には、フラグメントイオンの違いを利用して測定することができる。図7にプロリン、スレオニンと混合試料におけるマススペクトルを示した。

プロリンの ^{15}N 存在率測定に使用するマスフラグメントイオンは、*m/e* 166±5、スレオニンは *m/e* 153±5である。図7から分かるように、プロリンの測定イオン *m/e* 166 は、スレオニンのマススペクトルには出

現していない。また、スレオニンの測定イオン *m/e* 153は、プロリンのマススペクトルには存在していないので、プロリンの ^{15}N 存在率測定にさいして、*m/e* 166±5の範囲のイオン強度を測定するときには、スレオニンのフラグメントイオンの影響を受けない。また同様に、スレオニンの ^{15}N 存在率を測定するフラグメントイオン *m/e* 153±5の強度を測定したときには、プロリンのフラグメントイオンの影響を受けない。したがって、プロリンとスレオニンのGC溶出曲線が分離されていなくても測定が可能になる。それゆえ、プロリンの ^{15}N 存在率を測定するときには、マスレンジを *m/e* 166±5に設定しリピートスキューニングを行い、測定終了後、マスレンジを *m/e* 153±5に変更して測定することによりプロリン、スレオニンそれぞれの ^{15}N 存在率を測定し得る。したがって、GC溶出物が分離されず単一物質でない場合でも、特定のアミノ酸を誤認することなく、確実に分別測定できる場合がある。

また設定したTIM感度で記録できない場合でも、アミノ酸の溶出位置の前で、測定しようとするアミノ酸の *m/e* 値に設定して連続リピートスキューニングすることにより、微量量のアミノ酸の ^{15}N 存在率も測定し得る。たとえば、イソロイシン、ロイシンなどは発芽トウモロコシの生育時期によって、遊離アミノ酸として $10^{-11} \sim 10^{-12} \text{ g} \cdot \text{N}$ の程度にしか存在しないので、TIM記録計感度が0.5VレンジではGCピークとして記録されない(図8)。その場合でも、マススペクトルの範囲を *m/e* 182±5に設定し、光電子増倍管感度を増加し、GCピーク溶出予想位置の前から連続リピー

図 8 ^{15}N 標識硝酸塩を投与したトウモロコシの根における遊離アミノ酸の TIM クロマトグラム。

トスキャンニングを行うことによって、イソロイシン、ロイシンの m/e 182, 183 のマスフラグメントイオンをビジグラフ上に測定可能な程度に記録させることができる。いずれの場合も、GC ピーク溶出前に指定マスレンジでバックグラウンドを測定し、補正を行うことにより精度を上昇し得る。

また、アスパラギン酸以外のアミノ酸の ^{15}N 存在率の測定においても、同法が適用できるかどうかの妥当性を確かめるために実験を行ったが、十分信頼できる値が得られた¹⁶⁾。

4. ま と め

GC-MS によるアミノ酸の ^{15}N 存在率測定が行われなかったのは、 ^{15}N 存在率測定精度をあげる方法が開発されなかったことも一因と考えられる。

GC-MS で ^{15}N 存在率の測定精度をあげるためには、繰り返し測定する必要がある。しかし、GC で単離された溶出ピークの溶出時間は短いので、測定する質量範囲が広範囲にわたる場合には、マスペクトルを繰り返して測定することはおのずから制限を受ける。それに対処する方法は、磁場掃引の速度を早くすることである。それによってマスペクトルの測定回数を増加させることはできる。しかし、その測定法の場合には、マスペクトルの再現性および感度が悪くなることは避けられない。

そこで、マスペクトルの再現性と感度をよくするために、マスペクトルの質量測定範囲を狭くし、遅い速度で磁場掃引（通常の GC-MS 分析のときには、

m/e 0~1500(max) を15秒で走査するが、本実験時においては走査速度を1/13以下に落とした)を行い、また繰り返し測定（マスペクトルの測定範囲を狭く指定 ($A \pm 5$) したので繰り返し測定を多くすることができた)を行うことによって、再現性、精度、感度を大幅に引きあげることができた。

GC-MS を用いて ^{15}N 存在率を測定する方法として、MID (multi-ion detector, 多重イオン検出器) を用いる方法がある¹⁷⁾。加速電圧を変化させて特定のフラグメントイオンを測定する方法であるが、現用の装置では4種類くらいのイオン値しか指定できない。したがって、2, 3種類の物質を測定する場合には有用であるが、アミノ酸の場合のように多数の種類 (EGA 液相の場合、14種類のアミノ酸が分別される) の ^{15}N 存在率を測定しようとする場合には不適当である。

最近 GC-MS-コンピュータ法による MC (mass chromatography, マスクロマトグラフィ) が行われており、マスペクトルの種々な情報が容易に得られるようになった¹⁸⁾。しかしながら、この方法を行うには高価な装置が必要なこと、試料感度が悪いこと、また精度が落ちることなどの理由で多数の検体の検索には役立つが、精密実験には使用上に注意が必要であろう。

本実験に用いた *N*-TFA ブチルエステルアミノ酸誘導体では、アスパラギン、グルタミンのアミド基窒素の ^{15}N 存在率は測定できなかった。アスパラギン、グルタミンを TMS-MT 誘導体とし、それぞれの特定のマスフラグメントイオンについて、GC-MS の磁場リビートスキャンニング法を用いて測定することにより、アミド基窒素の ^{15}N 存在率が測定可能になった¹⁶⁾。

この確立された分析法を実際に生体試料を用いた ^{15}N トレーサ実験に使用したが、生体内の遊離アミノ酸中の ^{15}N 存在率測定が可能であった^{16), 19)}。

GC-MS を用いてアミノ酸の ^{15}N 存在率の測定法に関する検討を行ったが、従来行われてきた方法 (^{15}N 存在率測定用質量分析法, 発光分光分析法) に比べると、アミノ酸混合物を単一のアミノ酸に単離することなく、微量アミノ酸の ^{15}N 存在率が C.V. 0.2~0.3 % で測定できることが明らかになった¹⁶⁾。ダブルコレクタ方式の同位体存在率測定用質量分析計に比べると精度は落ちる (ダブルコレクタ方式の質量分析計では 0.01 atom % excess, GC-MS では 0.1 atom % excess ^{15}N)。しかし、GC-MS を使用するときには、極微量アミノ酸 (10^{-9} ~ 10^{-12} g·N) の ^{15}N 存在率を測定できるので、高濃度 ^{15}N 標識化合物を微量使用して、ト

レーサ実験を実施することができるものと考えられる。

GC-MS による微量のアミノ酸の ^{15}N 存在率の測定が可能になると生物学, 医学, 薬学などいろいろな分野でのアミノ酸, タンパク質の窒素代謝の研究に大いに貢献するものと考えられる。

文 献

- 1) 日本アイソトープ協会編:「アイソトープ手帳」, p. 20, 日本アイソトープ協会, 東京 (1980)
- 2) Thomas, J., Wolk, C.P., Shaffer, P.W., Austin, S.M. and Galonoky, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 501~07 (1975)
- 3) 和田英太郎: *Radioisotopes*, **25**, 676~85, 752~63 (1976)
- 4) 熊沢喜久雄: *ibid.*, **25**, 365~73, 426~36 (1976)
- 5) Burma, D.P. and Burris, R.H.: *J. Biol. Chem.*, **225**, 723~33 (1957)
- 6) 米山忠克, 熊沢喜久雄: 土肥誌, **43**, 262~63 (1972)
- 7) 馬場茂雄: *Radioisotopes*, **25**, 832~41 (1976)
- 8) 寒川喜三郎, 永井利和, 高橋誠二: *ibid.*, **25**, 135~41 (1976)
- 9) Gehrke, C.W., Roach, D., Zumwalt, R.W., Stalling, D.L., and Wall, L.L.: "Quantitative Gas-liquid Chromatography of Amino Acids in Proteins and Biological Substances", pp. 27~44, Analytical Biochemistry Laboratories, Inc., Columbia, USA (1968)
- 10) Gelpi, E., Koenig, W.A., Gibert, J., and Oro, J.: *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 604~13 (1969)
- 11) Vanden Heuvel, W.J.A. and Smith, J.L.: *ibid.*, **8**, 567~76 (1970)
- 12) 寒川 喜三郎, 秋森伯美, 山口益郎: 土肥誌, **49**, 383~88 (1978)
- 13) 寒川喜三郎, 秋森伯美: *Radioisotopes*, **25**, 407~09 (1976)
- 14) Yoneyama, T. and Kumazawa, K.: *Anal. Biochem.*, **67**, 327~31 (1975)
- 15) 安定同位元素研究会編:「安定同位体の医・薬学, 生物学への応用」, pp. 70~74, pp. 110~32 南江堂, 東京 (1975)
- 16) 寒川喜三郎: *Bull. Univ. Osaka Pref., Ser. B*, **33**, 105~33 (1981)
- 17) 寒川喜三郎, 秋森伯美, 山口益郎: 土肥誌講演要旨集, **26**, p. 80 (1980)
- 18) 立松晃, 宮崎浩, 鈴木真言:「医学と薬学のためのマススペクトロメトリー」, pp. 248~65, 講談社, 東京 (1975)
- 19) 寒川喜三郎, 山口益郎: 土肥誌, **50**, 217~24 (1979)