

## 大気圧化学イオン化 (APCI) LC/MSによるアミノ酸PTH誘導体の分析

Analysis of PTH Amino Acid with LC/APCI-MS.

内山 秀文\*・三浦 謹一郎\*\*・熊谷 泉\*\*・高井 信治\*

Hidefumi UCHIYAMA, Kin-ichiro MIURA, Izumi KUMAGAI and Nobuharu TAKAI

### 1. はじめに

今世紀半ばからタンパク質、ペプチドに関する研究はきわめて重要なテーマとして種々の分野で精力的に研究が進められている。構造タンパク、輸送タンパク、酵素、抗体など各種のタンパク質について機能と構造の相関について検討がなされ、さらに近時、特定の機能を持つタンパク質を人工的に設計し生産するといった試みも行われるに至っている。こうした研究においてアミノ酸配列や立体構造といったタンパク質の構造を知ることは重要であり、これまでもそのためのさまざまな方法が開発されまた改良されてきた。

エドマン法はタンパク質やペプチドの一次構造を決定する方法のひとつで、ペプチド鎖のN末端のアミノ酸をフェニルチオヒダントイン (PTH) 誘導体として遊離させこのPTH-アミノ酸を同定することによりN末端側からひとつずつアミノ酸配列を決定する方法として知られている。PTH-アミノ酸は当初薄層クロマトグラフィー (TLC) またはガスクロマトグラフィーにより同定されていたが、最近では高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により同定されている。しかしクロマトグラフィーでの物質の同定は溶出時間 (TLCの場合は展開された位置) に頼っているため定性的情報が乏しく、より確かな同定が求められておりGC/MSによる同定も行われているがあまり一般的ではない。

クロマトグラフィーが定性的情報に乏しいというのは一般的な弱点でありこれをカバーするために検出器をはじめとして各種の検討が行われている。LC/MSはその一つであり、HPLCの優れた分離能力と、質量分析器の幅広い定性能力の双方を生かした理想的な分析法であると考えられる。極性が大きい、熱に不安定、難揮発性などの理由からGCでは分析不可能、もしくは煩雑な誘導体化を必要とするような化学種をも直接分離同定することが可

能であるので分析対象も非常に広範囲にわたると期待されている。

ここではHPLCとAPCI-MS (HITACHI M-1000) を接続したシステムによりPTH-アミノ酸の標準品を分離同定した。このAPCI-MSでは、溶媒を気化して除去するため、従来のPTH-アミノ酸の逆相による分離系で用いられた酢酸ナトリウムは移動相として用いることができない<sup>1)</sup>。そこで移動相を酢酸アンモニウム/アセトニトリルとして、HPLCでの分離条件を検討したうえでマススペクトルを得た結果、溶出時間とマススペクトルからPTH-アミノ酸の従来より確実な同定が可能となりアミノ酸配列の決定への適用の可能性を得たので報告する。

### 2. 実験の概要

送液ポンプはHITACHI L-6000とL-6200の2台を用いた2液高圧グラジエントとし、L-5020カラムオープン、L-4200紫外可視検出器に接続した。

質量分析器は大気圧化学イオン化 (APCI) インターフェイスをもつ四重極質量分析器 (M-1000) を使用した。

カラムはSilica-ODS (化学品質検査協会) 4.6mm×150mm、カラム温度は70°C、溶離液はA: 0.2M酢酸アンモニウム (pH5.00)、B: アセトニトリルとし、流速0.8ml/minで図1に示すようなリニアグラジエント溶出を行った。

試料は標準品として購入したアミノ酸PTH誘導体 (和光純薬) を各成分が1~2 µg/mlの濃度に調製し、10 µl注入した。

### 3. 結果と考察

溶出の結果、図1のようなクロマトグラムを得た。各ピークは単品の溶出時間から推定した後、マススペクトルから同定したものをピークトップにアミノ酸の一字表記により示した。図からもわかるように3つの不分離ピークがある。

\*東京大学生産技術研究所 第4部

\*\*東京大学工学部

研究速報

図2にマスキロマトグラムを示す。溶出時間順に下から各成分の擬分子イオン  $[M+H]^+$  の質量数のマスキロマトグラムを示した。さらに図3-1~20に各ピークのマススペクトルを示した。

マスキロマトグラムからほとんどの成分について擬分子イオン  $[M+H]^+$  がベースピークとして効率よく検出されていることがわかる。C(システイン酸)については擬分子イオンが検出されなかった。

HPLC分離で不分離であったピーク、NとH(アスパラギンとヒスチジン)、VとP(バリンとプロリン)、FとK(フェニルアラニンとリジン)は、実際にアミノ酸配列決定の際には、マスキロマトグラムから同定可能である。また、同じ質量数をもつIとL(イソイロイシンとロイシン)の場合、HPLCによりほぼベースライン分離されているので同定が可能である。

4. 結 言

大気圧化学イオン化 (APCI) LC/MSを用い、溶出時間とマスキロマトグラムからPTH-アミノ酸の標準品を同定する手法について、APCIに使用可能な溶媒系の選択、脱溶媒条件、イオン化条件の観点から検討を行った。その結果、各成分はHPLCでの溶出時間が近いものや不分離ピークの場合ではマスキロマトグラムから、また質量数が同じ場合では溶出時間から、確実に同定することができた。これによりタンパク質、ペプチドのアミノ酸配列の決定

Column : Silica-ODS  
 Column size : 4.2mm×150mm  
 Column temp : 70°C  
 Eluent A : 0.02M CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, pH5.00  
 B : CH<sub>3</sub>CN  
 Flow rate : 0.8ml/min

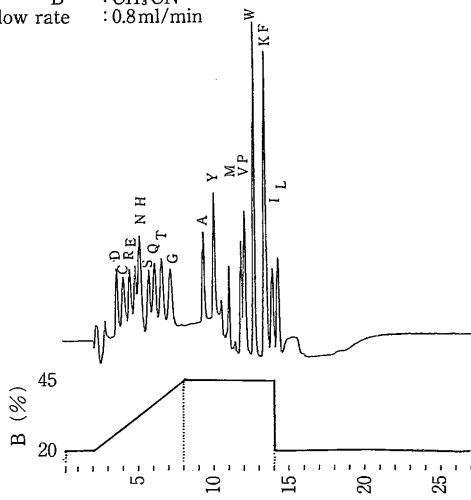


図1 アミノ酸PTH誘導体の分離

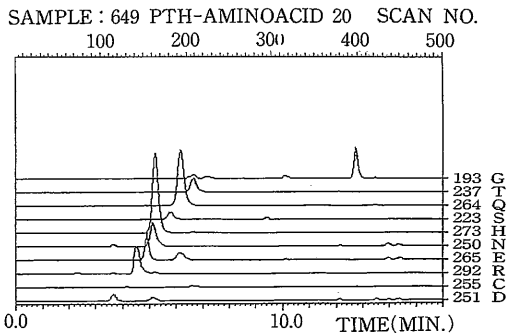
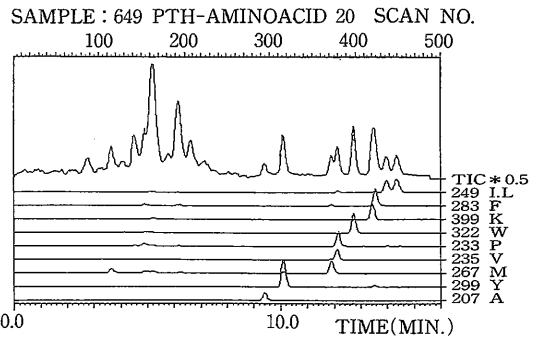


図2 マスキロマトグラム

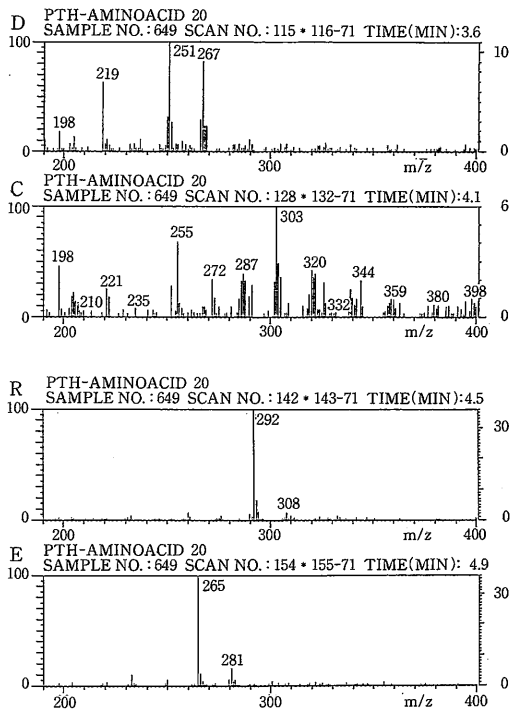


図3-1~4 マススペクトル

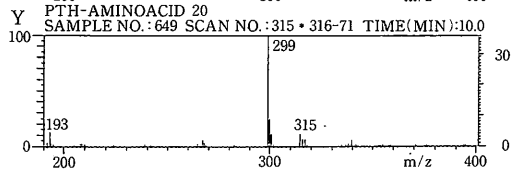
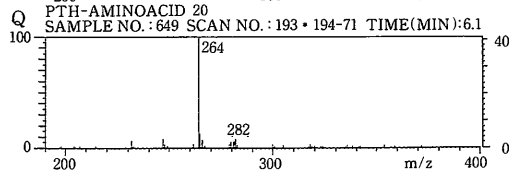
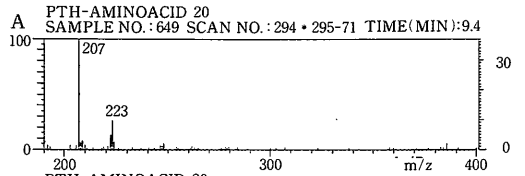
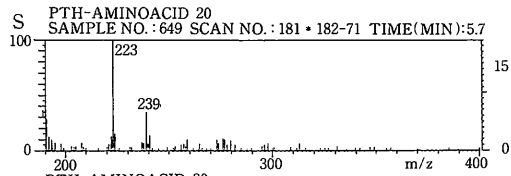
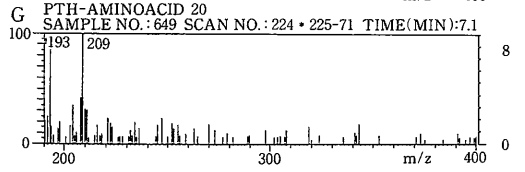
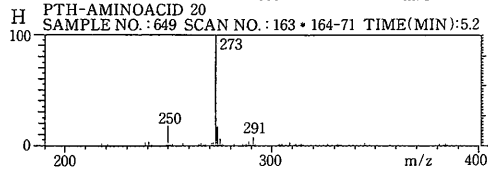
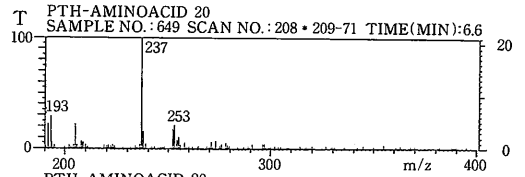
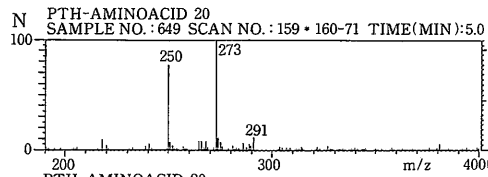


図 3-5~8 マススペクトル

図 3-13~16 マススペクトル

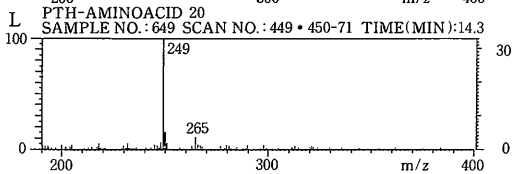
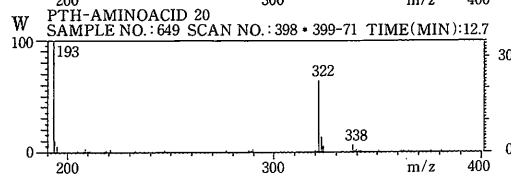
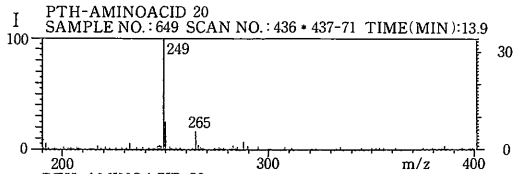
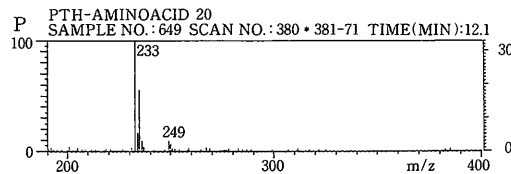
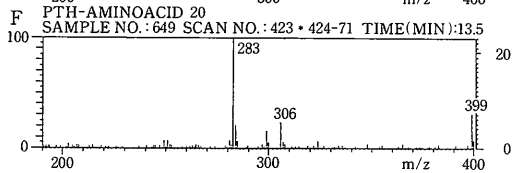
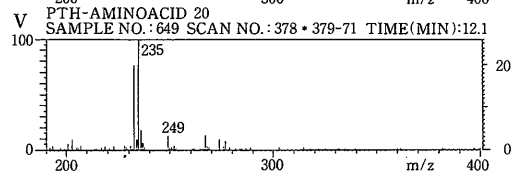
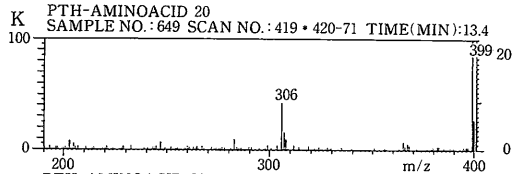
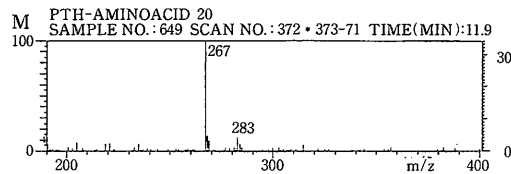


図 3-9~12 マススペクトル

図 3-17~20 マススペクトル

## 研究速報

への適用の可能性が明らかとなった。

今後の課題としては、完全なHPLC分離を目指して溶離液系の改良、エドマン分解による副生成物との分離に関する検討、感度に関する検討、さらに最終的には実際のアミノ酸配列の決定への適用を考えている。

(1991年6月4日受理)

## 参考文献

- 1) 土屋正彦, 大橋 守, 上野民夫: 質量分析法の新展開 現代化学増刊15 1988年9月
- 2) E.C. Huan, T. Wachs, J.J. Conboy, J.D. Henion,

Anal. Chem., 62, 713-725, (1990)

- 3) Sakairi, M.; Kambara, H., Anal. Chem., 60, 774-780, (1988)
- 4) Kushi, Y.; Rokukawa, C.; Numajiri, Y; Kato, Y.; Handa, S., Anal. Biochem., 182, 405-410, (1989)
- 5) Kato, Y.; Takahashi, S.; Hirose, H.; Sakairi, M.; Kambara, H., Biomed. Environ. Mass Spectrom., 16, 331-334, (1988)
- 6) Kato, Y.; Numajiri, Y., J. Chromatogr., 535 (1991)
- 7) 内山秀文 松島美一 永田佳子 高井信治, 生産研究, 43-4, 214-217, (1991)