Res. Org. Geochem. **31**, 33−49 (2015)　〔有機地球化学会 30 周年記念事業　地球・環境有機分子質量分析マニュアル No.29〕

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）によるアミノ酸のマススペクトル解析 *

高野 淑識 **・力石 嘉人 **・大河内 直彦 **

（2014 年 9 月 16 日受付，2014 年 12 月 1 日受理）

1. はじめに

イオンペアクロマトグラフィーは，アミノ酸のように酸性および塩基性の双性イオンを有する有機分子の分離に有効である（例えば，Eksborg and Schill, 1973; Gloor and Johnson, 1977; Chaimbault et al., 2000）。移動相に適切なイオンペア剤，例えば，フッ素化アルキル基を有するカルボン酸等を添加することにより，目的化合物にイオンペアが形成されて，カラムへの保持が十分に行われる。このため，様々なイオンペア剤を任意に添加することは，界面活性効果による溶質の化学的コントロールも可能にして，計測したい有機分子の分離条件の最適化に寄与する（Knox and Hartwick, 1981; Cecchi, 2008）。このように，イオンペアクロマトグラフィーには，有機分子の分離に関して，順相および逆相クロマトグラフィーを補完できる利点がある。また，揮発性を有するイオンペア剤を選定することにより，ソフトイオン化を主目的とした電子スプレーイオン化質量分析計（ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry, ESI-MS; イオンソースの原理は，Yamashita and Fenn, 1984 および Appendix を参照）へ導入することができる。

液体クロマトグラフィー／質量分析法（Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, LC/MS）は，1970 年後半から 80 年代にその原理がプロトタイプ化されて以降（例えば，Arpino and Guiochon, 1979; Vestal, 1984; Covey et al., 1986），分離カラムの多様性が広がり，質量分析計の技術開発が併せて進んだことから，有機化学を主体とした幅広い分野で有用な分析手法になっている（例えば，大河内，2010; 佐藤，2011; 中村，2014 などの総説を参照）。さらに，目的成分に応じた前処理の検討（例えば，中村，2014）により，試料由来のマトリックス効果の軽減化，夾雑物溶出に伴うイオンサプレッション効果やエンハンス効果（例えば，Mallet et al., 2004; Antignac et al., 2005; Taylor, 2005）の最小化を図ることができれば，LC/MS の分析手法の利点を相乗的に発展・応用することができる。このような最適化を行い，例えば，極性官能基を有する機能性分子に着目した Kaneko et al.（2014）では，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）を応用し，0.1−1.0 femto mol（フェムトモル）オーダーのメタン生成および嫌気的メタン酸化に関わる補酵素分子の超高感度定量法を開発した。

一方，LC/MS には，GC/MS のような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/）が存在しない。このため，個々の LC/MS ユーザーが，各自の目的に合わせて，化合物標品から初期検討と最適化のすべてを行っている。このような，現在の

*LC/ESI-MS analysis of underivatized amino acids and mass spectrum

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

LC/MS を取りまく状況を少しでも前進させるために，重要な有機分子のマススペクトルデータを示しておくのは将来に有益であると考える。この技術論文では，イオンペアクロマトグラフィーを用いたアミノ酸の分離と質量分析によるマススペクトル解析を報告する。

2. 分析方法

2.1. アミノ酸試薬

アミノ酸は，試薬メーカー（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; Shanghai Hanhong Chemical Co., Ltd.; Sigma-Aldrich Co. LLC.）から入手したアミノ酸標品: グリシン（glycine），アラニン（L-*α*-alanine），セリン（L-serine），トレオニン（L-threonine），アスパラギン（L-asparagine），グルタミン（L-glutamine），アスパラギン酸（L-aspartic acid），グルタミン酸（L-glutamic acid），プロリン（L-proline），バリン（L-valine），リシン（L-lysine），ロイシン（L-leucine），イソロイシン（L-isoleucine），メチオニン（L-methionine），ヒスチジン（L-histidine），アルギニン（L-arginine），フェニルアラニン（L-phenylalanine），チロシン（L-tyrosine），ヒドロキシプロリン（L-hydroxyproline），サルコシン（sarcosine），*β*-アラニン（*β*-alanine），N-エチルグリシン（N-ethylglycine），*α*-アミノ酪酸（L-*α*-aminobutyric acid），*α*-アミノイソ酪酸（*α*-aminoisobutyric acid），*β*-アミノイソ酪酸（D,L-*β*-aminoisobutyric acid），*γ*-アミノ酪酸（*γ*-aminobutyric acid），イソバリン（L-isovaline），*α*-アミノアジピン酸（L-*α*-aminoadipic acid），ノルバリン（L-norvaline），ノルロイシン（L-norleucine）を用いた。各アミノ酸は，0.1M HCl を用いて pH1 に調整した純水に溶かして定容・調整した。タンパク性アミノ酸および非タンパク性アミノ酸の分子情報を Table 1 に示す。

2.2. イオンペアクロマトグラフィーによるアミノ酸の分離と質量分析

アミノ酸は，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（HPLC/ESI-MS, Agilent 1100）を用いて分析した（Takano et al., 2015）。アミノ酸の導入量は，1.25 nmol から 160 nmol の範囲で行った。分離カラムは，Hypercarb column（4.6×150 mm, particle size 5 μm; Thermo Fisher Scientific Inc.）および同ガードカラム（4.6×10 mm, particle size 5 μm）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：20 mM ノナフルオロ吉草酸（Nonafluoropentanoic acid, NFPA; 分子量 264.05），B：100％アセトニトリル（分子量 41.05）を用い，流速 0.2 mL/min で，0 分（B 液：0％）から 60 分（B 液：60％）の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。分離カラムの固定相とイオンペア剤の親和性を確保するために，分析の前日に一晩，同条件かつ流速 0.1 mL/min でカラムの初期平衡化を行った。分析前と分析後の十分な平衡化の時間は，分離および保持時間の安定性を確保するために重要である。イオンペア剤の最適化は，既報（例えば，Cecchi, 2008）に詳しくまとめられている。

アミノ酸の検出は，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, 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 200℃，ドライガス窒素流量 10 L，ネブライザー圧力 50 psi，キャピラリー電圧 3000V で行った。ポジティブイオンモードおよびネガティブイオンモードでの適用について，溶質と溶液に関する酸塩基理論の原理を Fig. 1 に示す。ESI で生成するイオンは，試料溶液の pH に依存する傾向があるので，試料のコンディショニングは重要である。ここで，アミノ酸はイオン化され，$[M+H]^+$ の形で検出される。光学検出器は，ダイオードアレイ検出器（DAD, Agilent 1100）を用い，吸光特性のある芳香族アミノ酸を検出し，アミノ酸の分離状態とカラムのコンディショニングをモニターした（220–400 nm を検出；Appendix）。

3. 結果と考察

3.1. アミノ酸のマスフラグメントパターン

イオンペアクロマトグラフィーによる各アミノ酸の分離例を Fig. 2 に，アミノ酸の代表的なマスフラグメントパターンを Fig. 3 に示す。前述のように，pH を酸性側に調整したアミノ酸を用いた

Table 1. Summary of the ion-pair reversed-phase LC for underivatized amino acids showing elution order, chemical formula, molecular weight, parent ion, and fragment (*m/z*) by electrospray ionization mass spectrometry. #1, hydroxyproline is one of the important amino acids in collagen protein. #2, #3, Asparagine (Asn) and glutamine (Gln) will convert to aspartic acid (Asp) and glutamic acid (Glu), respectively, after hydrolysis. #4, The chromatographic co-elution of leucine and isoleucine may occur on this ion-pair LC separation. However, if the eluent and gradient program was modified with same ion-pair reagent, leucine and isoleucine were separated as shown in Takano et al. (2015) and the supplementary information. In the right-hand column, 'P' and 'NP' represent protein amino acid and non-protein amino acid, respectively.

Elution order	Abbreviation	Formula	Molecular weight	Retention time (min)	Parent ions $[M+H]^+$	Product ions (*m/z*)	Remarks
Glycine	Gly	$C_2H_5NO_2$	75	18.6	76	–	P
Serine	Ser	$C_3H_7NO_3$	105	22.3	106	88	P
Sarcosine	Sar	$C_3H_7NO_2$	89	23.6	90	–	NP
Alanine	Ala	$C_3H_7NO_2$	89	25.2	90	–	P
Hydroxyproline	Hyp	$C_5H_9NO_3$	131	26.3	132	–	NP (#1)
β-Alanine	*β*-Ala	$C_3H_7NO_2$	89	26.4	90	72	NP
Threonine	Thr	$C_4H_9NO_3$	119	27.0	120	102, 74	P
Asparagine	Asn	$C_4H_8N_2O_3$	132	27.3	133	116, 87	P (#2)
N-Ethylglycine	N-Et-gly	$C_4H_9NO_2$	103	28.3	104	–	NP
Glutamine	Gln	$C_5H_{10}N_2O_3$	146	29.3	147	130, 101	P (#3)
β-Aminoisobutyric acid	*β*-AiBA	$C_4H_9NO_2$	103	29.5	104	–	NP
Aspartic acid	Asp	$C_4H_7NO_4$	133	29.5	134	116, 88	P
α-Aminoisobutyric acid	*α*-AiBA	$C_4H_9NO_2$	103	29.6	104	–	NP
γ-Aminobutyric acid	*γ*-ABA	$C_4H_9NO_2$	103	30.1	104	–	NP
Proline	Pro	$C_5H_9NO_2$	115	30.1	116	–	P
α-Aminobutyric acid	*α*-ABA	$C_4H_9NO_2$	103	30.4	104	–	NP
Glutamic acid	Glu	$C_5H_9NO_4$	147	31.9	148	130, 102	P
Isovaline	Isoval	$C_5H_{11}NO_2$	117	34.4	118	72	NP
Valine	Val	$C_5H_{11}NO_2$	117	34.8	118	72	P
α-Aminoadipic acid	*α*-AAA	$C_6H_{11}NO_4$	161	35.4	162	144, 116	NP
Norvaline	Norval	$C_5H_{11}NO_2$	117	35.7	118	72	NP
Lysine	Lys	$C_6H_{14}N_2O_2$	146	36.6	147	130	P
Leucine	Leu	$C_6H_{13}NO_2$	131	38.5	132	86	P
Isoleucine	Ile	$C_6H_{13}NO_2$	131	38.5	132	86	P
Methionine	Met	$C_5H_{11}NO_2S$	149	39.0	150	133, 104	P
Histidine	His	$C_6H_9N_3O_2$	155	40.1	156	110	P
Norleucine	Norleu	$C_6H_{13}NO_2$	131	40.4	132	86	NP
Arginine	Arg	$C_6H_{14}N_4O_2$	174	43.1	175	–	P
Phenylalanine	Phe	$C_9H_{11}NO_2$	165	51.3	166	120	P
Tyrosine	Tyr	$C_9H_{11}NO_3$	181	53.2	182	165, 136	P

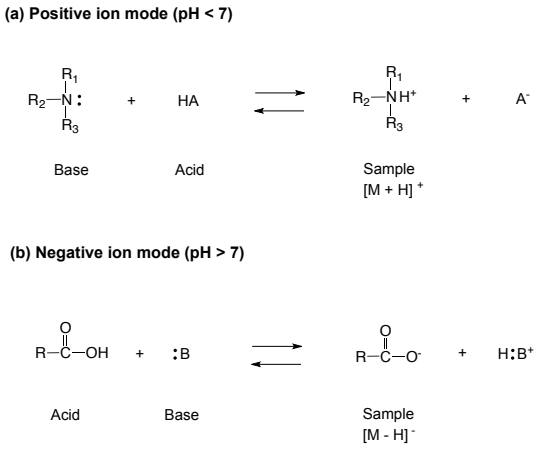


Fig. 1. The principles of acid-base theory in solution chemistry for LC/ESI-MS optimization.

ESI-MS のポジティブモードでは，$[M+H]^+$ の親イオン（プロトン付加分子イオン）に加え，アミノ酸の官能基部位で開裂した後，H 原子が付加したプロダクトイオンが生成する。

まず，アミノ酸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（Fig. 3-a）。例えば，バリンのマススペクトルは，$[M+H]^+=118$ であり，$[M+H-46]^+$ に対応する *m/z* 72 がある（Fig. 4）。このフラグメントパターンは，アルキル基を有するアミノ酸であるノルバリン，イソバリン，ロイシン，ノルロイシン，芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン，チロシン，複素環式アミノ酸であるヒスチジンに共

Fig. 2. (1/2)

(a) Protein AAs

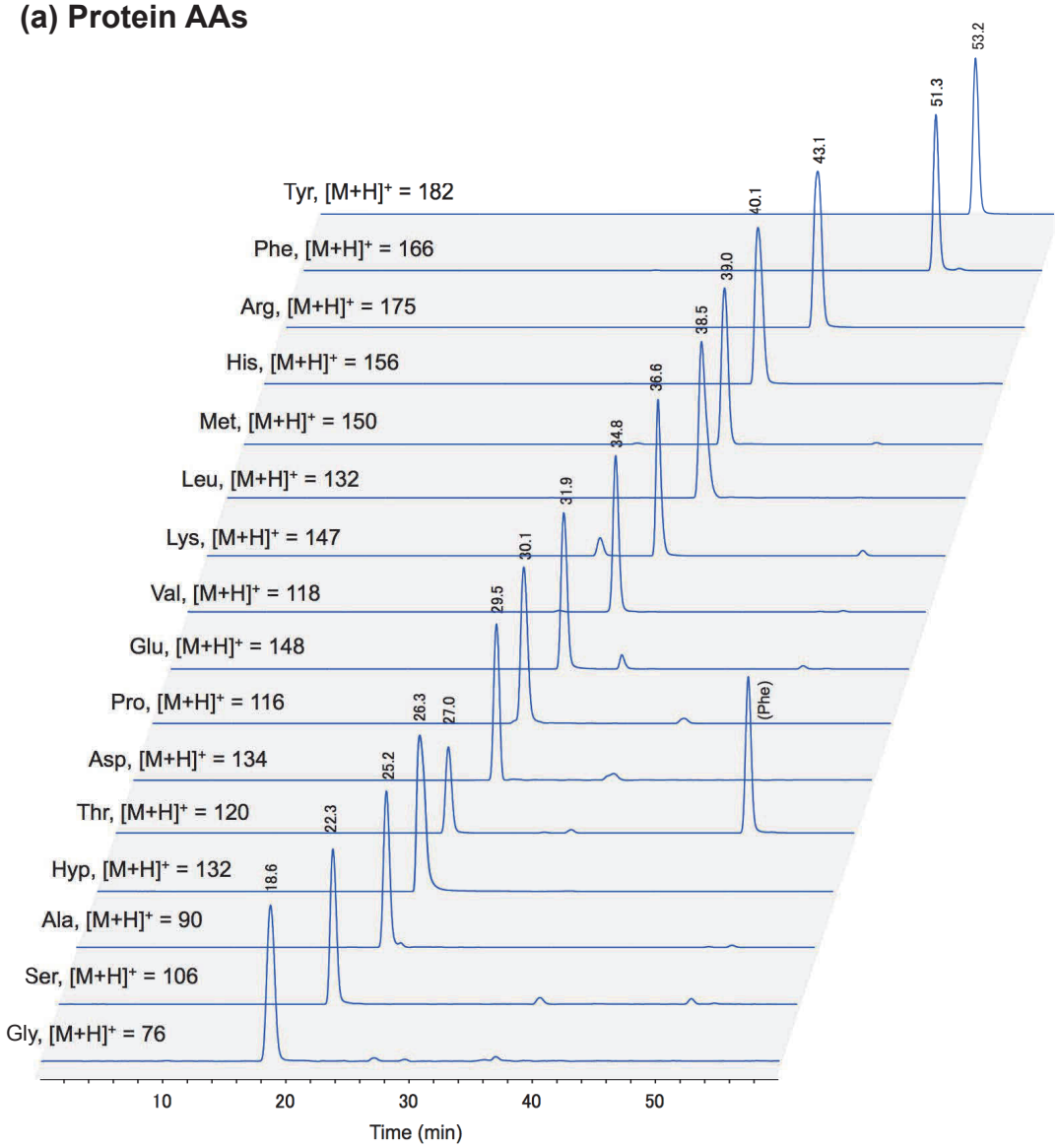
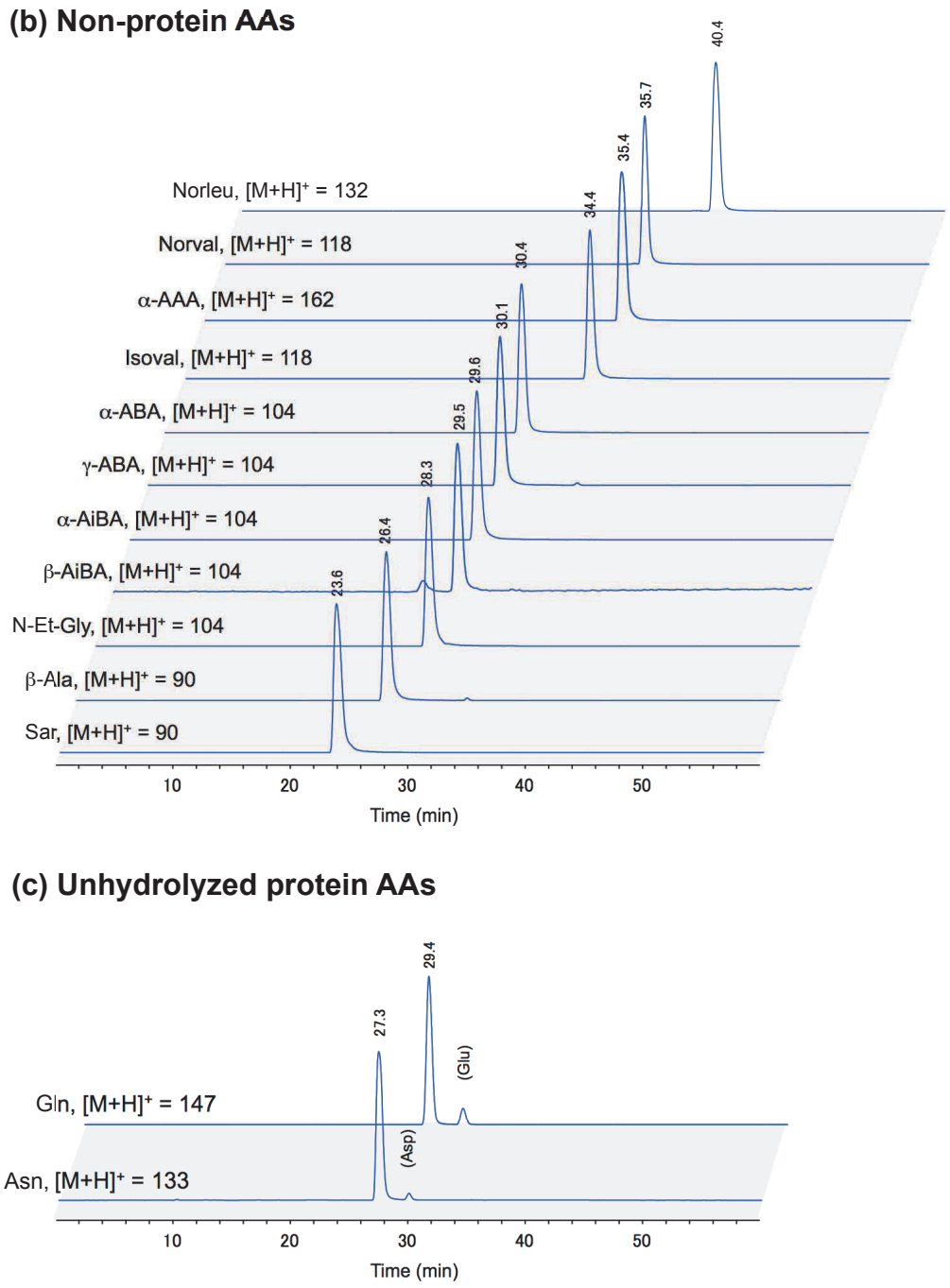


Fig. 2. Extracted ion chromatogram (EIC) of underivatized amino acids on LC/ESI–MS analysis. Abbreviations: Glycine, Gly; Serine, Ser; Alanine, Ala; Threonine, Thr; Aspartic acid, Asp; Proline, Pro; Glutamic acid, Glu; Valine, Val; Lysine, Lys; Leucine, Leu; Isoleucine, Ile; Methionine, Met; Histidine, His; Arginine, Arg; Phenylalanine, Phe; Tyrosine, Tyr; Asparagine, Asn; Glutamine, Gln; Sarcosine, Sar; Hydroxyproline, Hyp; β-Alanine, β-Ala; N-Ethylglycine, N-Et-gly; β-Aminoisobutyric acid, β-AiBA; α-Aminoisobutyric acid, $\alpha-$AiBA; γ-Aminobutyric acid, γ-ABA; α-Aminobutyric acid, α-ABA; Isovaline, Isoval; α-Aminoadipic acid, α-AAA; Norvaline, Norval; Norleucine, Norleu. A co-injection of threonine and phenylalanine showed the same product ion (m/z 120) at differing retention times. For separation condition, please see Takano et al. (2015).

Fig. 2. (2/2)


(b) Non-protein AAs
Norleu, [M+H]+ = 132
Norval, [M+H]+ = 118
α-AAA, [M+H]+ = 162
Isoval, [M+H]+ = 118
α-ABA, [M+H]+ = 104
γ-ABA, [M+H]+ = 104
α-AiBA, [M+H]+ = 104
β-AiBA, [M+H]+ = 104
N-Et-Gly, [M+H]+ = 104
β-Ala, [M+H]+ = 90
Sar, [M+H]+ = 90
40.4
35.7
35.4
34.4
30.4
30.1
29.6
29.5
28.3
26.4
23.6
10
20
30
40
50
Time (min)
(c) Unhydrolyzed protein AAs
Gln, [M+H]+ = 147
Asn, [M+H]+ = 133
29.4
27.3
(Glu)
(Asp)
10
20
30
40
50
Time (min)

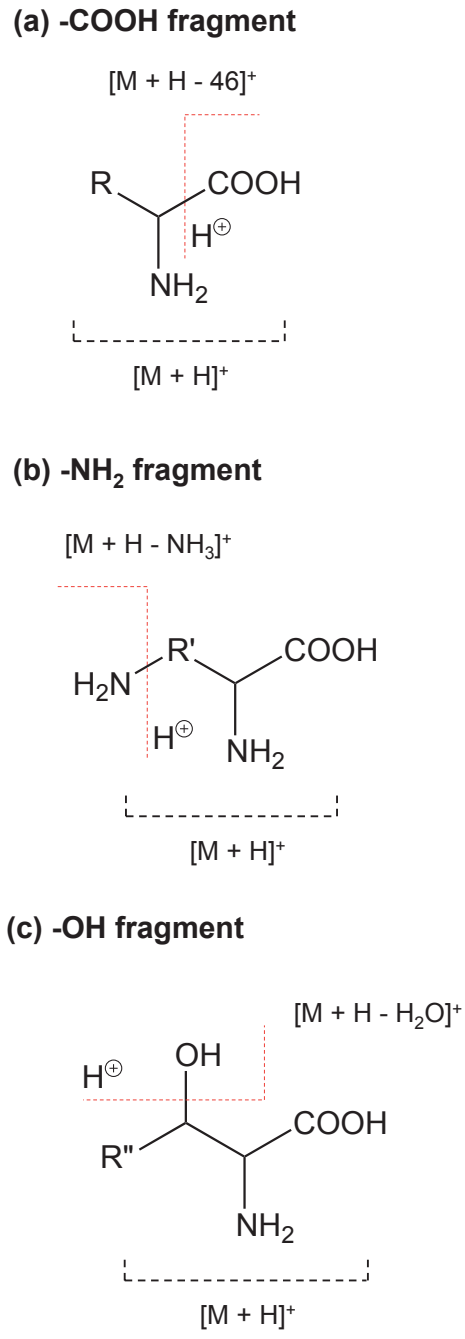


Fig. 3. Representative fragmentation patters for diagnosis ion of underivatized amino acids showing, parent ion $[M+H]^+$ with **(a)** –COOH fragment (-HCOOH), **(b)** $–NH_2$ fragment ($-NH_3$), and **(c)** –OH fragment ($-H_2O$).

通している。アミノ基を 2 つ有するグルタミンやアスパラギン等にも見られる。

次に，アミノ基（$-NH_2$）の脱離による生成したイオン $[M+H-NH_3]^+=[M+H-17]^+$ が見られる分子種もある（Fig. 3-b）。例えば，リシンのマススペクトルは，$[M+H]^+=147$ であり，$[M+H-17]^+$ に対応する *m/z* 130 がある（Fig. 4）。このフラグメントパターンは，アスパラギンやグルタミン，あるいは，含硫アミノ酸であるメチオニン等にも共通する。

ヒドロキシル基（-OH）の脱離による生成したイオン $[M+H-H_2O]^+=[M+H-18]^+$ が見られる場合もある（Fig. 3-c）。例えば，セリンのマススペクトルは，$[M+H]^+=106$ であり，$[M+H-18]^+$ に対応する *m/z* 88 がある（Fig. 4）。このフラグメントパターンは，ヒドロキシル基を有するアミノ酸であるトレオニン，酸性アミノ酸のアスパラギン酸やグルタミン酸，あるいは，*α*-アミノアジピン酸や *β*-アラニンにも共通する。

3.2. 本質量分析の留意点と他の検出器への応用

各アミノ酸の保持時間とマススペクトルを比較することにより，アミノ酸の同定を行うことができ，さらに，濃度既知のスタンダードを用いれば，定量を行うことができる。ここで挙げているプロダクトイオンは，前述の質量分析計の条件で行ったものであり，例えば，イオン化の設定条件を変えることにより，フラグメントパターンにも多少の変化が現れることがある。前述 3.1. のような主要イオンの他，例えば，グルタミン酸では，$[M+H-HCOOH-H_2O]^+$ が生じ，グルタミンでは，$[M+H-HCOOH-NH_3]^+$ が生じる。

トレオニン（$[M+H]^+=120$）とフェニルアラニン（$[M+H]^+=166$）を共打ちすると，フェニルアラニンのカルボキシル基由来のフラグメント化により（$[M+H-46]^+=120$），同じイオンクロマトグラム（EIC, *m/z* 120）上にシグナルが検出される（Fig. 2）。質量数が同一で保持時間が近いアミノ酸分子が含まれる試料の場合，後述の 2 次元分析によるクロスチェックが重要である。タンパク性および非タンパク性アミノ酸の溶出順序，略記，化学式，分子量，プロダクトイオンを Table 1 にまとめた。ここで用いているノナフルオロ吉草酸の分子量は，

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

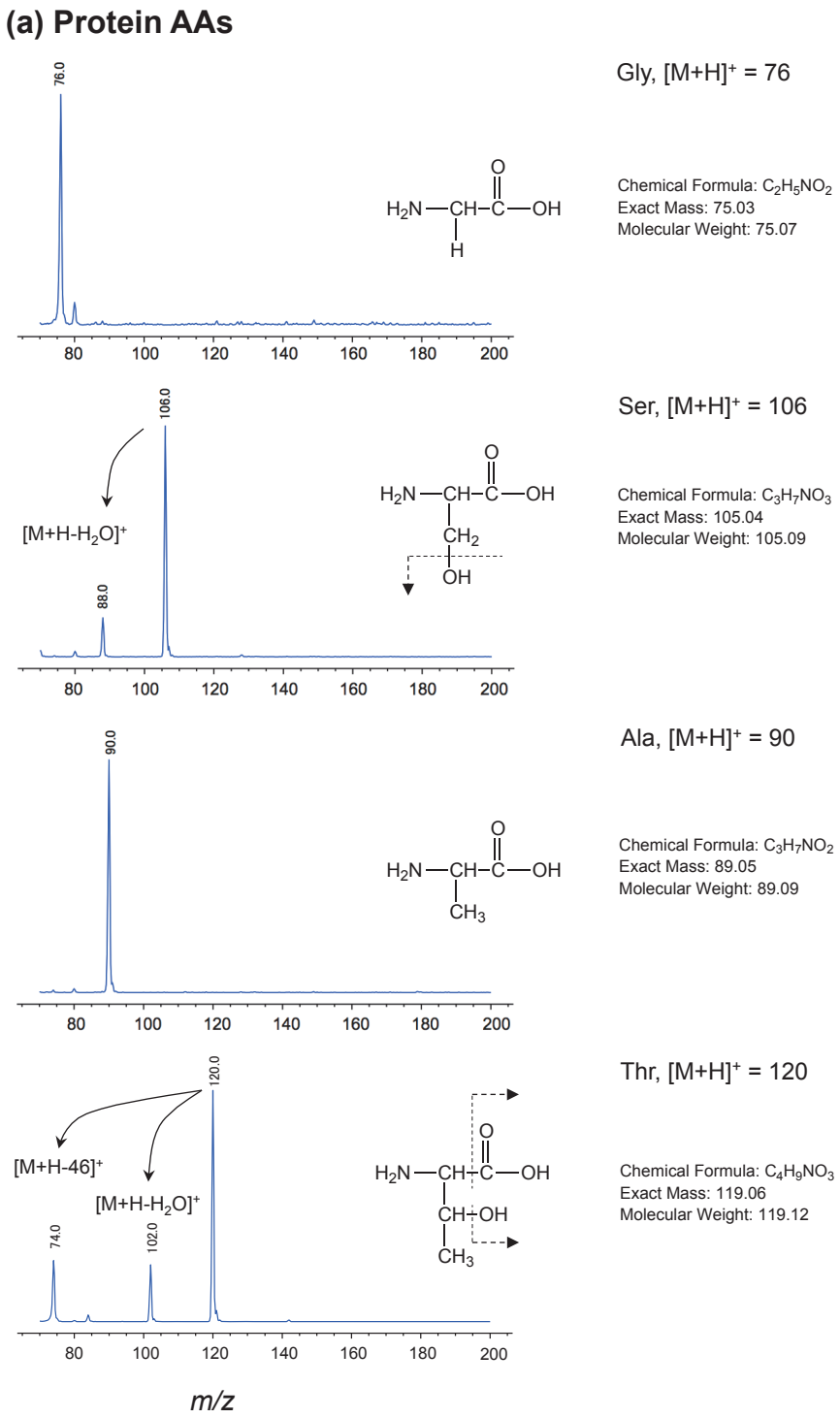
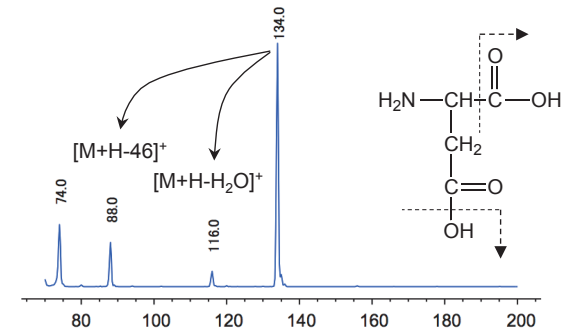


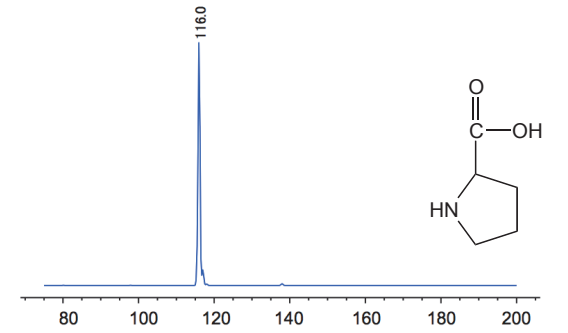
Fig. 4. (a) Underivatized protein amino acids and **(b)** non-protein amino acids for the identification. Observed product ions and their fragmentation patterns by ESI–MS were shown. The chemical formula, exact mass, molecular weight, and theoretical values of their corresponding masses (*m/z*) are also shown.

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



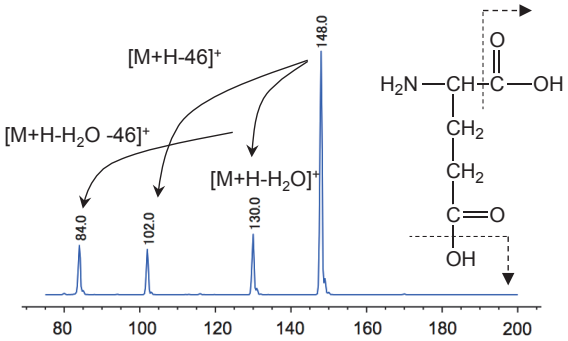
Asp, $[M+H]^+$ = 134

Chemical Formula: $C_4H_7NO_4$
Exact Mass: 133.04
Molecular Weight: 133.10



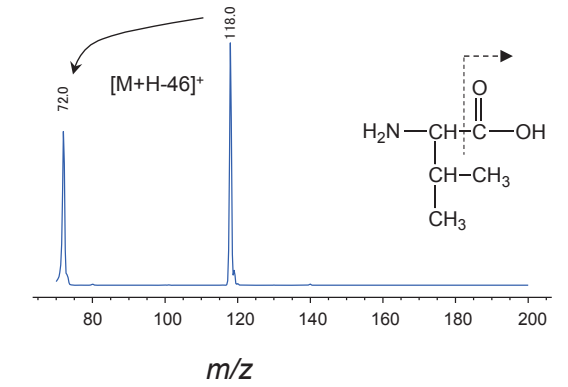
Pro, $[M+H]^+$ = 116

Chemical Formula: $C_5H_9NO_2$
Exact Mass: 115.06
Molecular Weight: 115.13



Glu, $[M+H]^+$ = 148

Chemical Formula: $C_5H_9NO_4$
Exact Mass: 147.05
Molecular Weight: 147.13



Val, $[M+H]^+$ = 118

Chemical Formula: $C_5H_{11}NO_2$
Exact Mass: 117.08
Molecular Weight: 117.15

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

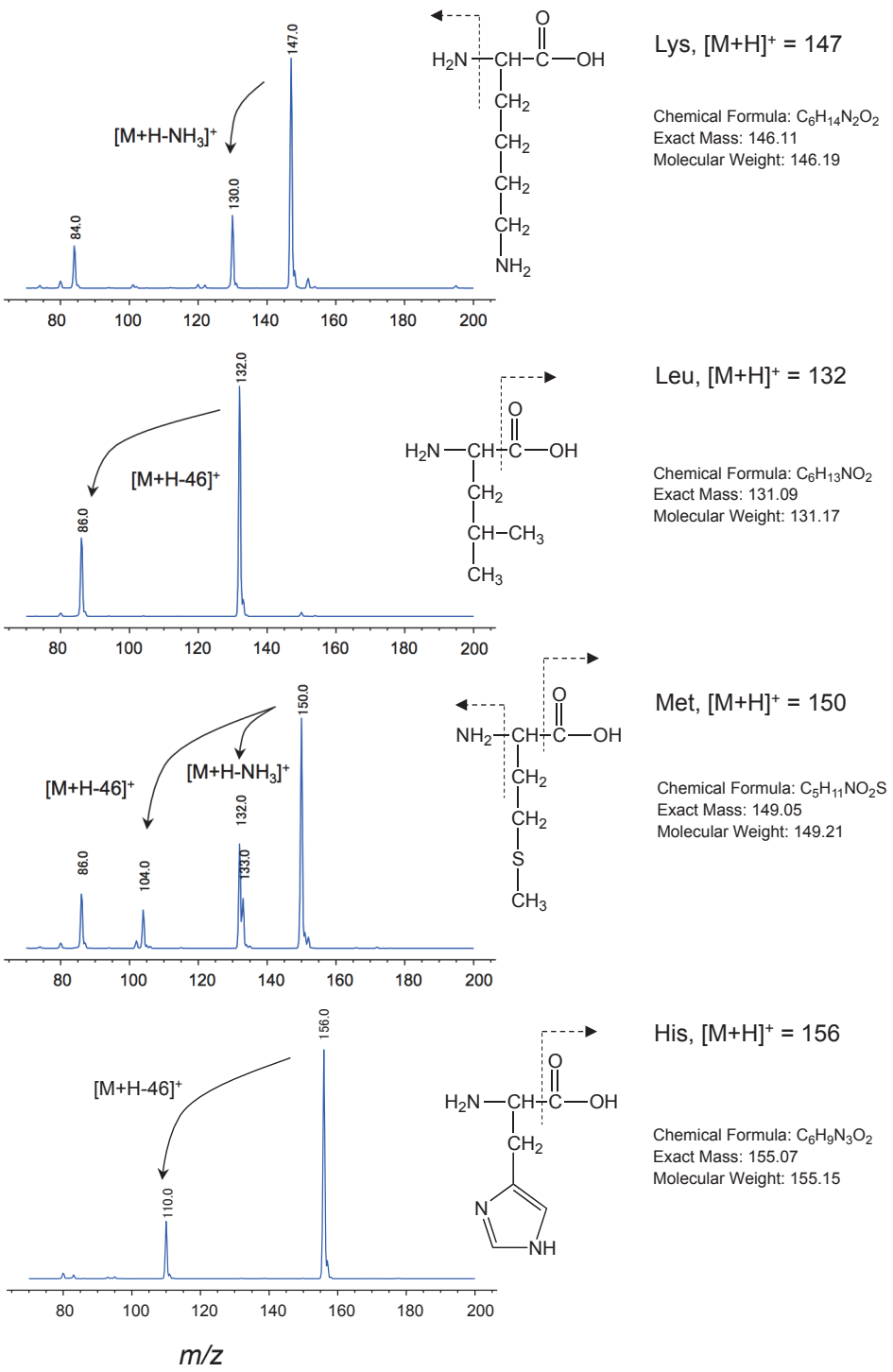
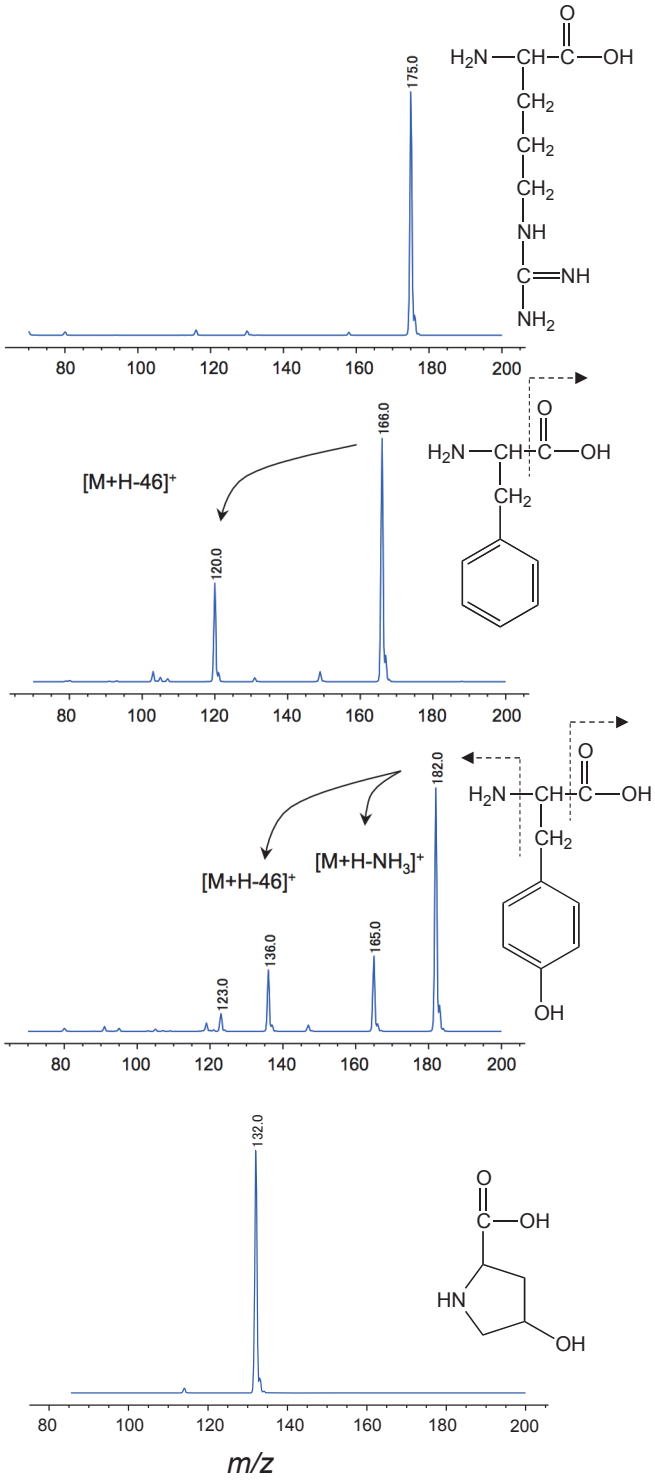

[M+H-NH3]+
147.0
130.0
84.0
80 100 120 140 160 180 200
H2N CH C OH O
CH2 CH2 CH2 CH2 NH2
Lys, [M+H]+ = 147
Chemical Formula: C6H14N2O2
Exact Mass: 146.11
Molecular Weight: 146.19
[M+H-46]+
132.0
86.0
80 100 120 140 160 180 200
H2N CH C OH O
CH2 CH CH3 CH3
Leu, [M+H]+ = 132
Chemical Formula: C6H13NO2
Exact Mass: 131.09
Molecular Weight: 131.17
[M+H-46]+
[M+H-NH3]+
150.0
132.0
133.0
104.0
86.0
80 100 120 140 160 180 200
NH2 CH C OH O
CH2 CH2 S CH3
Met, [M+H]+ = 150
Chemical Formula: C5H11NO2S
Exact Mass: 149.05
Molecular Weight: 149.21
[M+H-46]+
156.0
110.0
80 100 120 140 160 180 200
H2N CH C OH O
CH2 N NH
His, [M+H]+ = 156
Chemical Formula: C6H9N3O2
Exact Mass: 155.07
Molecular Weight: 155.15
m/z

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



Arg, $[M+H]^+$ = 175

Chemical Formula: $C_6H_{14}N_4O_2$
Exact Mass: 174.11
Molecular Weight: 174.20

Phe, $[M+H]^+$ = 166

Chemical Formula: $C_9H_{11}NO_2$
Exact Mass: 165.08
Molecular Weight: 165.19

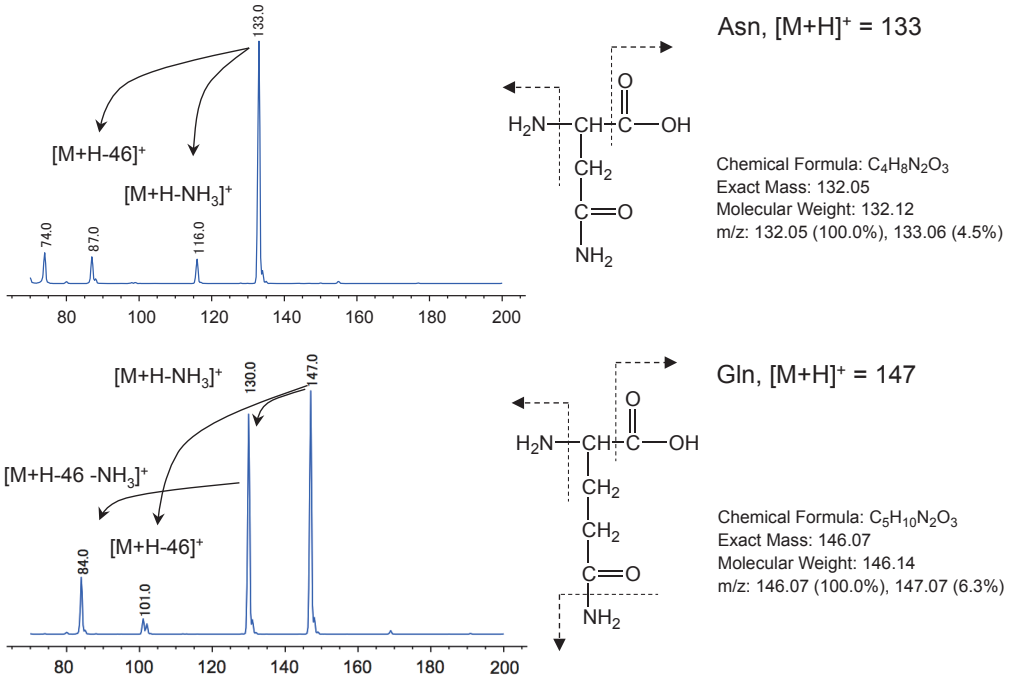
Tyr, $[M+H]^+$ = 182

Chemical Formula: $C_9H_{11}NO_3$
Exact Mass: 181.07
Molecular Weight: 181.19

Hyp, $[M+H]^+$ = 132

Chemical Formula: $C_5H_9NO_3$
Exact Mass: 131.06
Molecular Weight: 131.13

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



264.05 であり，Table 1 に示すアミノ酸分子のマススペクトルに干渉しない。

アミノ酸の同定について十分な確認が行われている場合，質量分析計の代わりにコロナ荷電化粒子検出器（Corona CAD, Charged Aerosol Detector）や蒸発光散乱検出器（Evaporative Light Scattering Detector, ELSD）による検出を行うことが可能である。Corona CAD（Appendix: Thermo Fisher Scientific Inc.）は，定量性に優れ，日常のメンテナンスが質量分析計よりも比較的容易であることから，質量分析法やフォトダイオードアレイ検出法の補完的な検出装置として有効と考えられる。

4. 今後の展望

4.1. 二次元クロマトグラフィーへの応用

有機分子を 1 次元 LC で分離し，必要性に応じて 2 次元目のクロマトグラフィーへの展開することが可能である。2 次元クロマトグラフィーへのアプローチは，非タンパク性アミノ酸とタンパク性アミノ酸が混在している特殊な試料を測定する際の分析確度保証にも有効である。Hamase et al.（2014）では，非タンパク性アミノ酸を含む網羅的な立体異性体比（D/L 比）の正確な記載を報告している。また，アミノ酸に揮発性を持たせるために，適切な誘導体化（例えば，N- ピバロイルイソプロピル化；力石ら，2009；エトキシカルボニル - エチルエステル化；山口ら，2009）およびガスクロマトグラフィーによる分離（例えば，Chikaraishi et al., 2010）を経て，包括的 LC x GC，あるいは，マルチハートカット LC-GC へと応用することも可能となる。すなわち，試料由来の網羅的なアミノ酸組成（例えば，Chikaraishi et al., 2009）から，任意の分子レベルで，より高分解能なターゲット分析へ進めることを意味する。

4.2. アミノ酸分子レベル同位体研究への展望

本稿で述べたアミノ酸の分離は，誘導体化を行っていない。著者らは，アミノ酸のアミノ基由来の窒素について，前処理と分離の際に同位体分別が無い分析条件の最適化を行ってきた（例えば，Chikaraishi et al., 2010; Takano et al., 2010, 2015）。こ

Fig. 4. (b) (1/3)

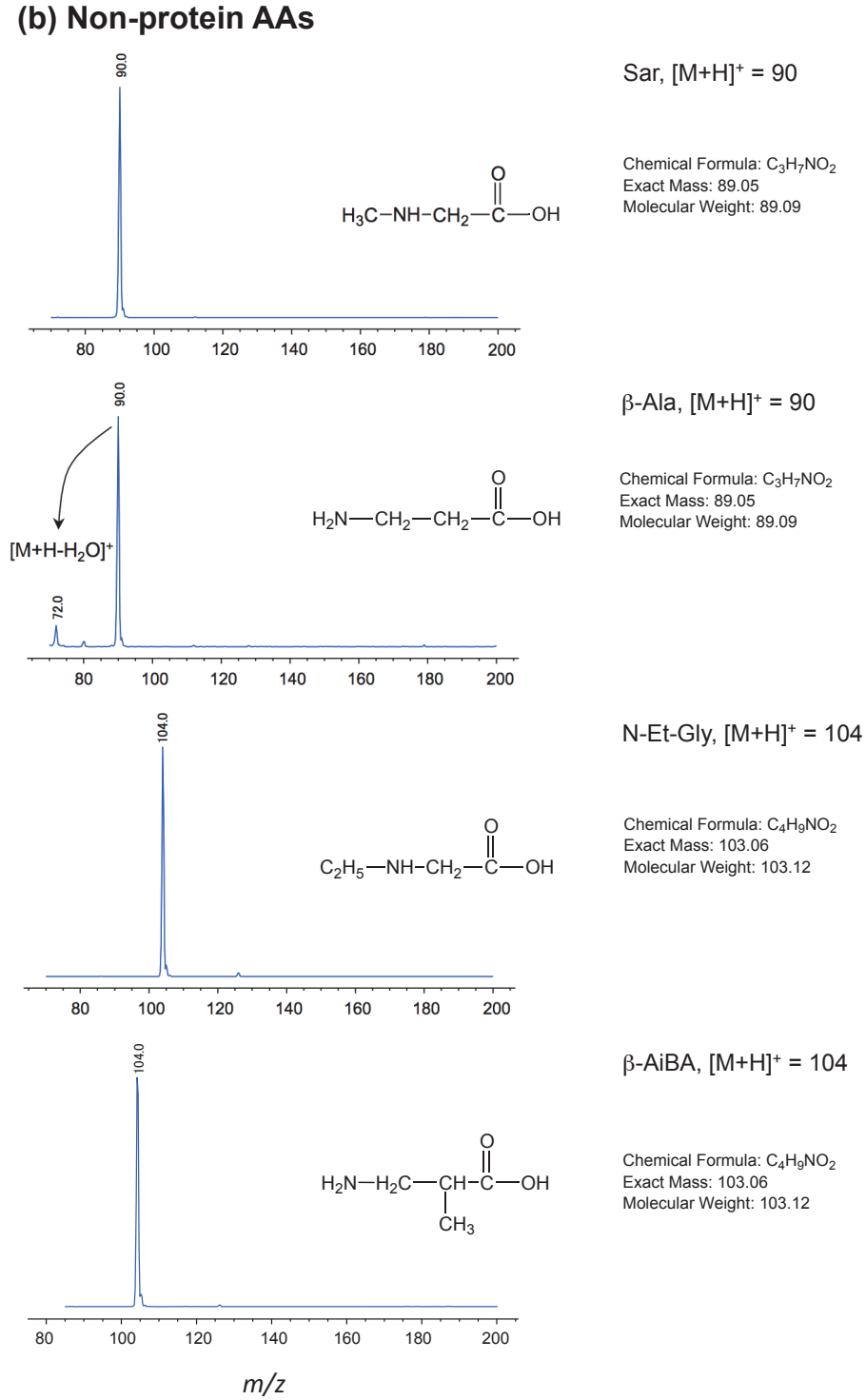


Fig. 4. (a) Underivatized protein amino acids and **(b)** non-protein amino acids for the identification. Observed product ions and their fragmentation patterns by ESI–MS were shown. The chemical formula, exact mass, molecular weight, and theoretical values of their corresponding masses (*m/z*) are also shown.

Fig. 4. (b) (2/3)

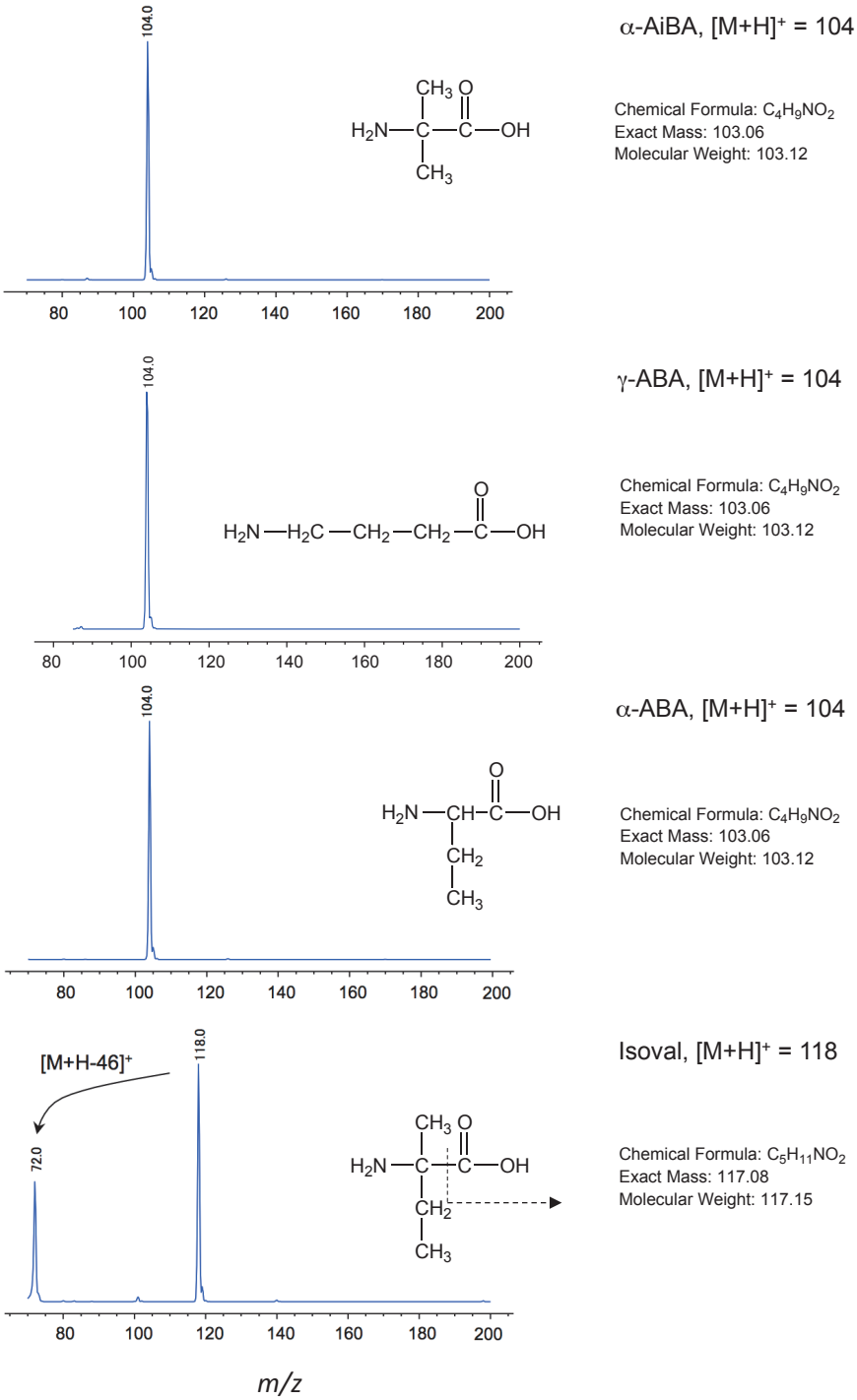
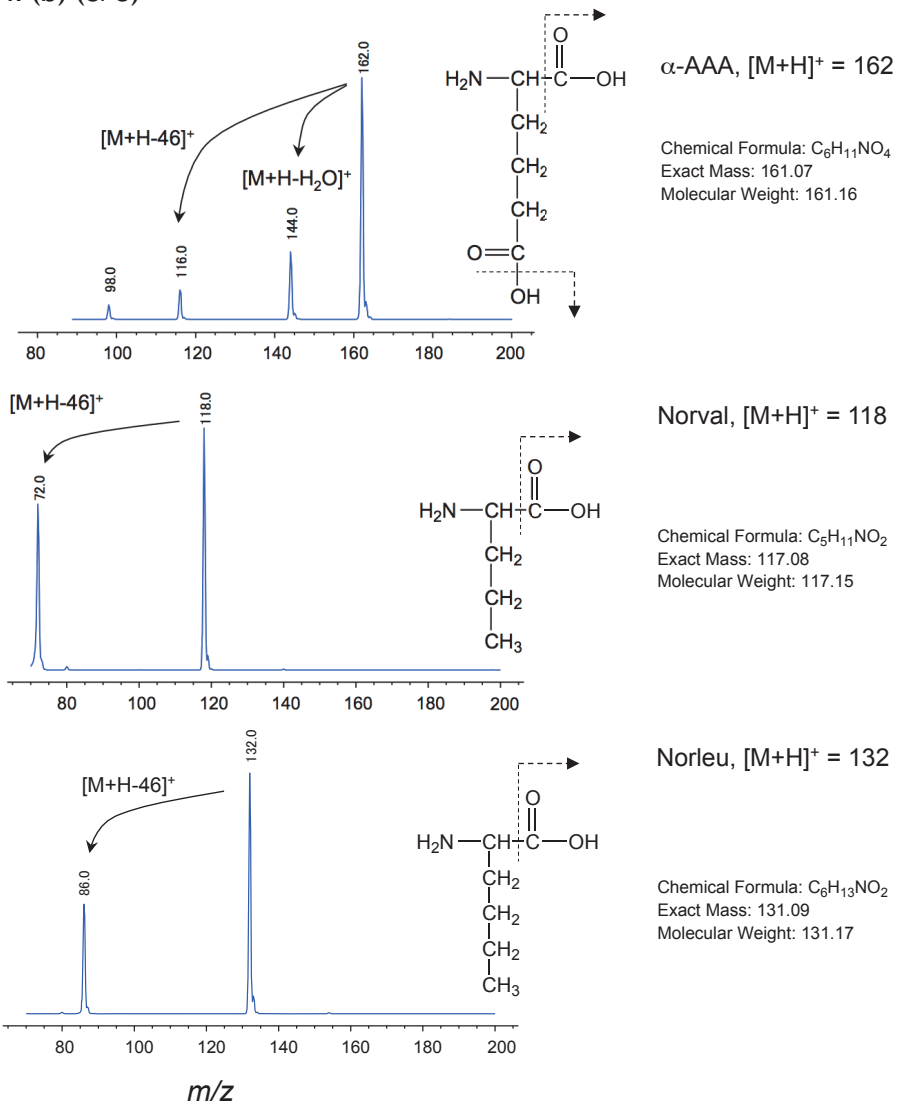

104.0
80
100
120
140
160
180
200
α-AiBA, [M+H]+ = 104
Chemical Formula: C4H9NO2
Exact Mass: 103.06
Molecular Weight: 103.12
γ-ABA, [M+H]+ = 104
Chemical Formula: C4H9NO2
Exact Mass: 103.06
Molecular Weight: 103.12
α-ABA, [M+H]+ = 104
Chemical Formula: C4H9NO2
Exact Mass: 103.06
Molecular Weight: 103.12
[M+H-46]+
118.0
72.0
Isoval, [M+H]+ = 118
Chemical Formula: C5H11NO2
Exact Mass: 117.08
Molecular Weight: 117.15
m/z

Fig. 4. (b) (3/3)



のことは，マトリックス効果を効率的に除去することでアミノ酸分子レベルあるいは立体異性体分子レベル（Takano et al., 2009; Ohkouchi and Takano, 2014）での窒素同位体比の挙動を高精度かつ高確度で記載できることを意味する。ここで示した既報では，アミノ酸の炭素同位体比の検証（例えば，Chikaraishi and Ohkouchi, 2010）については触れていないが，分離条件と精製法の最適化を行うことにより，極微量スケール（例えば，Ogawa et al., 2010）での炭素同位体比（$\delta^{13}C$）の動態を含め，アミノ酸分子レベル放射性炭素年代測定（例えば，Itahashi et al., 2014）への展開に道が開かれる。

謝　辞

本研究を進めるにあたり，エムエス機器株式会社の海宝 弘行 様からは，技術的な助言を頂いた。山本修一教授（創価大学）と一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

Antignac J.-P., de Wasch K., Monteau F., De Brabander H., Andre F. and Le Bizec B. (2005) The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Anal. Chim. Acta* **529**, 129-136.

Arpino P. J. and Guiochon G. (1979) LC/MS coupling. *Anal. Chem.* **51**, 682-701.

Cecchi T. (2008) Ion pairing chromatography. *Critical Rev. Anal. Chem.* **38**, 161-213.

Chaimbault P., Petritis K., Elfakir C. and Dreux M. (2000) Ion-pair chromatography on a porous graphitic carbon stationary phase for the analysis of twenty underivatized protein amino acids. *J. Chromatogr. A* **870**, 245-254.

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.: Method*s **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. *Earth, Life, and Isotopes* (Edited by Ohkouchi N., Tayasu I. and Koba K.), Kyoto Univ Press, pp. 367-386.

Chikaraishi Y. and Ohkouchi N. (2010) An improved method for precise determination of carbon isotopic composition of amino acids. *Earth, Life, and Isotopes* (Edited by Ohkouchi N., Tayasu I. and Koba K.), Kyoto Univ Press, pp. 355-366.

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.

Covey T.R., Lee E.D., Bruins A.P. and Henion J.D. (1986) Liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **58**, 1451A-1461A.

Eksborg S. and Schill G. (1973) Ion pair partition chromatography of organic ammonium compounds. *Anal. Chem*. **45**, 2092-2100.

Gloor R. and Johnson E.L. (1977) Practical aspects of reverse phase ion pair chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **15**, 413-423.

Hamase K., Nakauchi Y., Miyoshi Y., Koga R., Kusano N., Onigahara H., Naraoka H., Mita H., Kadota Y. and Nishio Y. (2014) Enantioselective determination of extraterrestrial amino acids using a two-dimensional chiral high-performance liquid chromatographic system. *Chromatogr.* **35**, 103-110.

Itahashi Y., Takano Y., Ogawa N.O., Ohkouchi N. and Yoneda M. (2014) Radiocarbon dating of single amino acid in archaeological bone specimens. *Anthropological Sci.*, **122**, 190.

Kaneko M., Takano Y., Chikaraishi Y., Ogawa N.O., Asakawa S., Watanabe K., Shima S., Krueger M., Matsushita M., Kimura H. and Ohkouchi N. (2014) Quantitative analysis of coenzyme F430 in environmental samples: a new diagnostic tool for methanogenesis and anaerobic methane oxidation. *Anal. Chem.* **86**, 3633-3638.

Knox J.H. and Hartwick R.A. (1981) Mechanism of ion-pair liquid chromatography of amines, neutrals, zwitterions and acids using anionic hetaerons. *J. Chromatogr. A.* **204**, 3-21.

Mallet C.R., Lu Z. and Mazzeo J.R. (2004) A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **18**, 49-58.

中村 洋（2014）LC/MS, LC/MS/MS の基礎と応用（日本分析化学会 編），オーム社，pp.1-278.

大河内直彦（2010）高速液体クロマトグラフィー. 地球化学講座 第 8 巻「地球化学実験法」（田中 剛・吉田尚弘 共編），培風館，pp. 153-157.

Ohkouchi N. and Takano Y. (2014) Organic nitrogen: sources, fates, and chemistry. *Treatise on Geochemistry, Vol. 12, 10: Organic Geochemistry* (Edited by Birrer, B., Falkowski, P., Freeman, K.), Elsevier, pp. 251-289.

Ogawa N.O., Nagata T., Kitazato H. and Ohkouchi N. (2010) Ultra sensitive elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer for stable nitrogen and carbon isotope analyses. *Earth, Life, and Isotopes*

(Edited by Ohkouchi N., Tayasu I. and Koba K.), Kyoto Univ Press, pp. 339-353.

佐藤浩昭 (2011) LC/MS. 環境分析ガイドブック（日本分析化学会 編），丸善，pp.157-164.

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 δ^{15}N and microbial peptidoglycan studies. *Anal. Chem.* **81**, 394-399.

Takano Y., Kashiyama Y., Ogawa N.O., Chikaraishi Y. and Ohkouchi N. (2010) 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. (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.

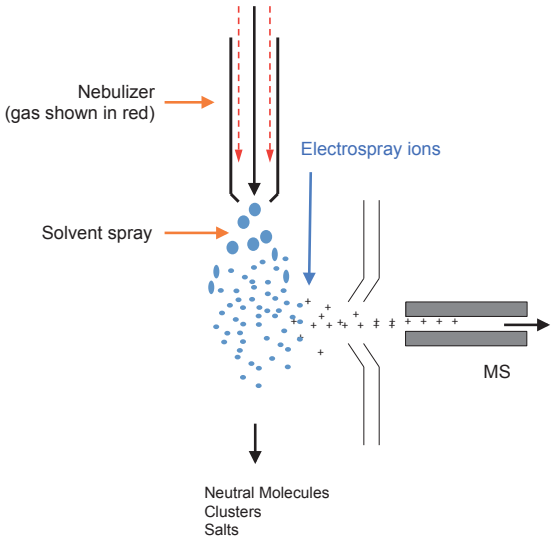
Taylor P.J. (2005) Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical Biochem.* **38**, 328-334.

Vestal M.L. (1984) High-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Science* **226**, 275-281.

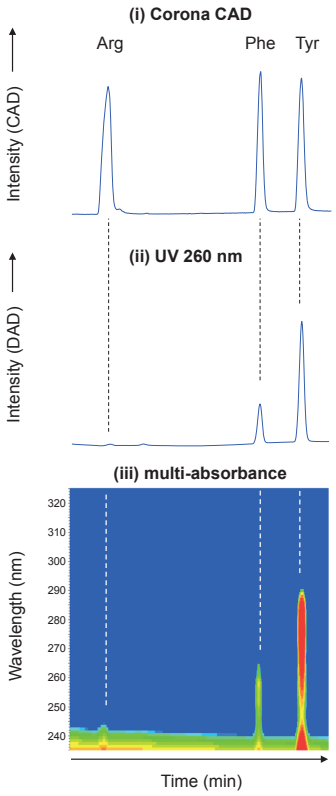
山口保彦，力石嘉人，横山祐典，大河内直彦 (2009) アミノ酸（エトキシカルボニル-エチルエステル誘導体）の GC/MS による解析．*Res. Org. Geochem. 25*, 71-83.

Yamashita M. and Fenn J.B. (1984) Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **88**, 4451-4459.

Abbreviations : LC/MS, Liquid Chromatography/Mass Spectrometry; ESI-MS, ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry; EIC, Extracted Ion Chromatogram; DAD, Diode Array Detector; MRM, Multiple Reaction Monitoring; NIST, National Institute of Standards and Technology; Corona CAD, Corona Charged Aerosol Detector; ELSD, Evaporative Light Scattering Detector.



appendix 1. Illustration of typical electrospray ion source (ESI).



appendix 2. Comparison of responses determined by other online detectors for corona CAD (Thermo Fisher Scientific Inc.) and the diode array detector (DAD) with the UV absorbance. Modified after Takano et al. (2015)