

九州大学中央分析センター

55

# センター ニュース

平成9年1月

## 目 次

分析機器解説シリーズ(54) . . . . .	1
飛行時間型質量分析計	
トピックス . . . . .	9
一酸化窒素(NO)消去剤PTIOによる生体内NOの測定	
お知らせ . . . . .	13

## 分析機器解説シリーズ(54)

### 飛行時間型質量分析計

中央分析センター 渡 辺 美登里

#### 1. はじめに

質量分析計は一般に、イオンを作るイオン源、イオンを分離する部分(質量分析部)、イオンを検出する検出器から構成されている。質量分析部としては、磁場型と四重極型が普及しているが、そのほかに飛行時間型、イオントラップ型、フーリエ変換型もある。表1に各質量分析計の一般的特徴を示す。ここでは飛行時間型質量分析計について概説する。

#### 2. 原理

イオンは一定の加速電圧  $V$  で加速されると、イオンの質量  $m$ 、イオンの速度  $v$ 、イオンの電荷数  $z$ 、電気素量  $e$  としたとき、イオンに与える運動エネルギーは、

$$mv^2/2 = zeV$$

であり、イオン速度  $v$  は、

$$v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}} \quad (1)$$

となる。一定の長さ  $L$  の分析管の中を速度  $v$  で飛行する時間  $t$  は  $L/v$  であり、イオンの  $m/z$  によって飛行時間  $t$  が異なる。

$$t = \frac{L}{v} = L\sqrt{\frac{m}{2zeV}} \quad (2)$$

$$m/z = 2eVt^2/L^2 \quad (3)$$

加速電圧  $V$  と分析管の長さ  $L$  は一定のため、飛行時間  $t$  を測定することによってイオンの質量分析が行われる。このように  $m/z$  の違いによってイオンの飛行する時間が異なることを利用して質量分析を行う方法を飛行時間型質量分析法と呼ぶ。飛行時間質量計(time-of-flight mass spectrometer: TOFMS)の原理を図1に示す。イオン群はレーザーによるイオン化などによりパルス状に生成され、真空の分析管を通過する間に飛行時間により分離され、質量の小さいイオンから順次イオン検出器に到達する。式(3)より、イオンの  $m/z$  は飛行時間  $t$  の2乗に比例することがわかる。特徴としては、飛行時間を無限大まで測定すれば無限大の質量数まで測定でき

ることになり、理論的には質量範囲の制限はなく高質量（たとえば分子量  $10^5$  領域）の質量分析に適しているが、分解能は低いことがあげられる。また、スキャンを行う必要のある他の質量分析法と異なり、TOFMS は生成したイオンすべてを検出器に導くため、原理の上から高感度である。

表 1 . 各質量分析計の - 般的特徴

	分解能	質量範囲 m/z	質量分析部の 真空度	装置の 大きさ	操作性	イオン化の 組合せ	GC/MS	LC/MS	MS/MS	特徴
二重収束磁場型 質量分析計	高	中	中	中～大	難	EI, CI APCI, (TSI) FAB, LSIMS ESI, (MALDI)	可	可	可	広く用いられている。 高分解能である。
四重極型 質量分析計	低	低	低	小～中	易	EI, CI APCI, TSI (FAB), (LSIMS) ESI, (MALDI)	可	可	可	広く用いられている。 安価である。
飛行時間型 質量分析計	低	高	低	小～中	易	MALDI	不可	不可	可	MALDI に適している。 理論的に質量範囲が無制限。 単独で MS/MS が可能。 安価である。
イオントラップ型 質量分析計	低	低	低	小	易	EI, CI APCI, TSI (FAB), (LSIMS) ESI, (MALDI)	可	可	可	超高分解能である。 単独で MS/MS が可能。
フーリエ変換型 質量分析計	高	中	高	大	難	EI, CI FAB, LSIMS ESI, MALDI	可	可	可	超高分解能である。 単独で MS/MS が可能。

( ) は一般的ではないが組み合わせ可能なイオン化。

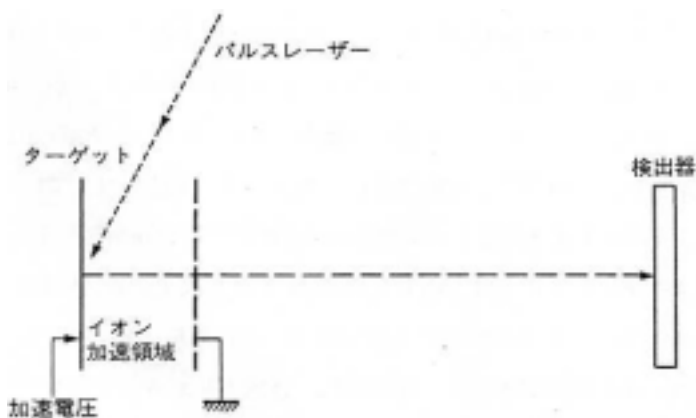


図 1 . 飛行時間型質量分析計の原理

## 2 . TOFMS に用いられるイオン化法

通常、TOFMS でのイオン化は MALDI (matrix - assisted laser desorption ionization) 法が使われる。MALDI 法は、イオン化に用いるレーザーの波長を特異的に吸収する固体、または液体のマトリクスの中に微量の試料を均一に分散させ、ビーム径を絞ったパルス状のレーザーを照射することにより、試料分子をイオン化する方法である。

### 1 ) イオン化の機構

このイオン化の機構はまだ明確に説明されていない部分があるが、M.Karas らによる報告 (1987 年) によると以下のように説明される。

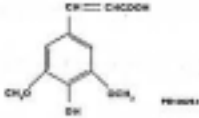
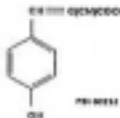
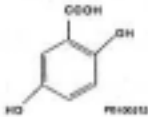
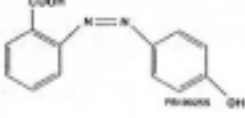
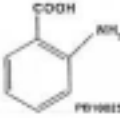
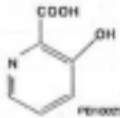
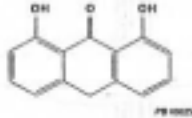
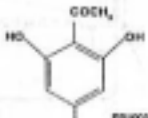
- ・照射されたレーザー光をマトリクス分子が共鳴吸収して励起状態となる。このとき単位体積当たりのエネルギーが特定の量 (イオン出現照射強度) となると固相の崩壊を引き起こし、イオンが気相に脱離する。
- ・イオン化は励起状態、あるいは基底状態にあるマトリクスと試料分子との間での化学反応によって生じる。
- ・試料分子は過剰のマトリクスの中で個々に孤立しているか、あるいは小さなクラスタとして存在する必要がある。
- ・レーザー照射による固相の崩壊はマトリクス分子の構造によって支配される。すなわち同じ試料においてもマトリクスが異なれば、そのイオン出現照射強度は異なる。

以上のように MALDI 法においてはマトリクスが極めて重要な意味を持つ。

### 2 ) マトリクス

MALDI 法で用いるマトリクスは、イオン化に使用するレーザーの波長に吸収帯を持つこと、固体マトリクスであれば、試料と共通の溶媒に溶け、かつ溶媒の蒸発と共に試料分子を取り込みながら結晶化するという条件を満たしていなければならない。MALDI 法の初期の研究には Nd : YAG レーザーの 4 倍高調波 (波長 266nm) が使用されていたため、ニコチン酸等、この波長を吸収する化合物がマトリクスとして使用されていたが、現在では、低価格でかつ再現性に優れ、メンテナンスフリーの窒素レーザーの波長 (337nm) で使用できるマトリクスが発見され、この波長で使用できるマトリクスが主流となっている。現在、分析目的で使用される主なマトリクスとその調整法を表 2 に示す。TOFMS と組み合わせれば、現時点で分子量では免疫グロブリン M (M.W. : 900kDa) まで検出でき、検出限界も amol レベルに達している。また、イオン化が可能な化合物は、ペプチド、タンパク質、多糖類、複合脂質、核酸関連物質等の生体関連物質一般以外に、合成ポリマー、オリゴマー、金属配位化合物や無機化合物まで極めて広範囲に及んでおり、イオン化法の中では、最も適応範囲が広いと言える。

表2. MALDIマトリクス

Matrix	Application	Structure	Color of crystals/solution	Matrix Solution
Sinapinic acid MW 224.07	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peptides</li> <li>Proteins</li> </ul>		White	<ul style="list-style-type: none"> <li>10 g/liter in 50:50 water/ethanol<sup>†</sup></li> <li>10 g/liter in 70:30 water/acetonitrile (0.1% TFA)<sup>†</sup></li> </ul>
Alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid (αCHCA) MW 189.04	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peptides</li> <li>Proteins</li> </ul>		Yellow	<ul style="list-style-type: none"> <li>10 g/liter in 70:30 water/acetonitrile (0.1% TFA)<sup>†</sup></li> <li>10 g/liter in 50:50 water/acetonitrile (0.1% TFA)</li> </ul>
2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB) MW 154.03	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peptides (mixtures)</li> <li>Carbohydrates</li> <li>Glycolipids (neg ion mode)</li> <li>Polar synthetic polymers</li> </ul>		White	10 g/liter in 90:10 water/ethanol <sup>†</sup>
2-(4-hydroxyphenylazo)-benzoic acid (HABA) MW 242.07	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proteins</li> <li>Polar and nonpolar synthetic polymers</li> </ul>		Orange	-1.3 g/liter in 50:50 water/acetonitrile or in 40:40:20 water/acetonitrile/methanol <sup>†</sup>
2-aminobenzoic (anthranilic) acid MW 137.05	Oligonucleotides		Yellow	-10 g/liter in 80:20 water/acetonitrile (20% w/w nicotinic acid can be added) <sup>†</sup>
3-hydroxypicolinic acid MW 139.03	Oligonucleotides		Light brown	-80 g/liter in 50:50 water/acetonitrile <sup>†</sup>
Dithranol MW 226.06	Nonpolar synthetic polymers		Yellow	10 g/liter in tetrahydrofuran <sup>†</sup>
2,4,6 Trihydroxy acetophenone (THAP) MW 168.04	Oligonucleotides		White	0.5 M 2,4,6-THAP in ethanol, mix with 0.1 M aqueous diammonium hydrogen citrate (2:1) <sup>†</sup>

### 3. 装置と特徴

装置の一例を図2に示す。窒素レーザー光は、フィルターによって調光され光学レンズで集光された後、サンプルに照射される。発生したイオンは、 $V_0$ の印加電圧によって右方向に引き出される。引き出されたイオンは、イオンレンズ電圧 $V_L$ を印加することにより、各イオンが平行飛行できるようになる。ここで、偏光板電圧 $V_D = 0$ かつリフレクタ電圧 $V_R = 0$ の場合、イオンは直線飛行し検出器1に到達する。この方法をリニア(linear)型と呼び、飛行途中で中性粒子になったものやメタステーブルイオンも検出できるので高感度であるが、イオン発生時の初期エネルギーの分布がそのまま飛行時間に反映するため分解能は低い。これに対し、 $V_D = 0$ 、かつリフレクタ電圧( $|V_R| > |V_0|$ )を印加した場合、イオンはリフレクタ内で折り返され、検出器2に到達する。これをリフレクタ(reflector)型と呼び、イオン反射電界を付加することにより、イオン発生時のエネルギー分布により同一イオンの飛行時間が分散していた状態が打ち消されて収束される。すなわち、 $m/z$ が同一であるイオンの全飛行時間がエネルギーの大小によらずに等しくでき、質量分解能の高い測定が可能である。しかし、リフレクタ型では折り返す前までのメタステーブルイオンは、未分解の安定イオンとの飛行時間が異なり、また中性粒子は折り返さないため、とくに単寿命のイオンの感度が低い。寿命の短い高質量イオンについてはリニア型の方が適している。リフレクタ型では、イオン源で生成したイオン群から飛行時間によりプリカーサーイオンを選択し、リフレクタの前でpost source decay(PSD)<sup>1)</sup>、またはリフレクタの後で衝突解離(CID)<sup>2)</sup>により生じたプロダクトイオンを検出することにより、MS/MS測定(図3)が可能である。

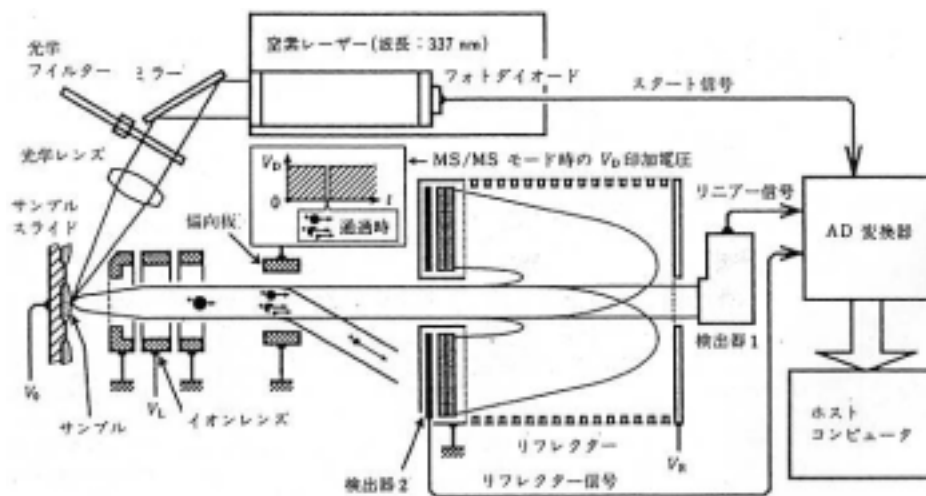
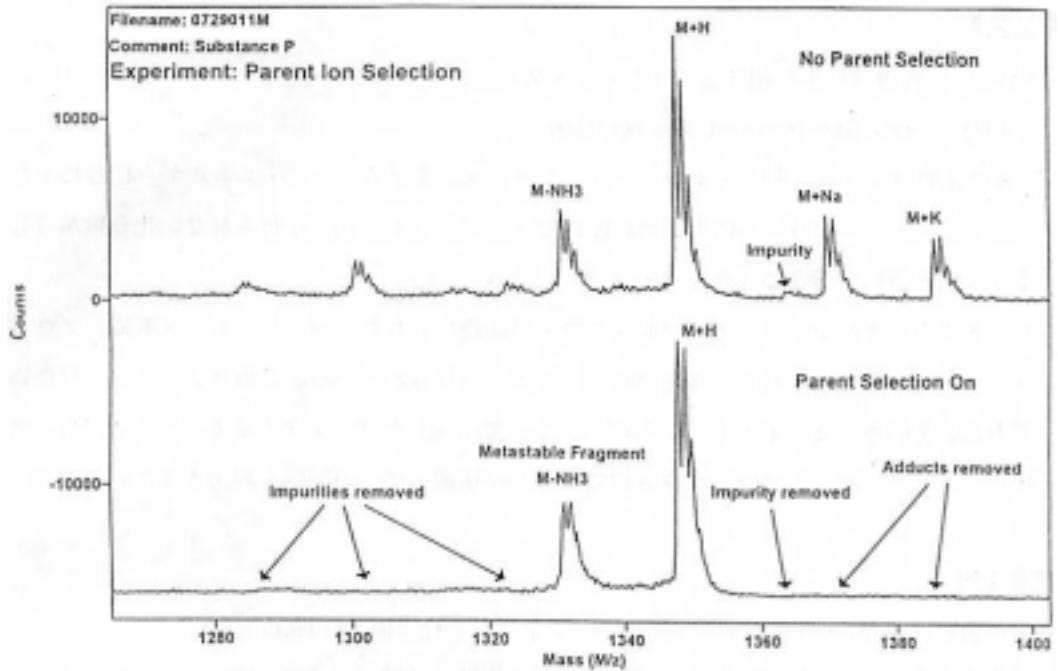


図2. MALDI - TOFMS / MS装置例



タイムダイオンセクタによる、Substance P 分子イオン  $MH^+$  の分離

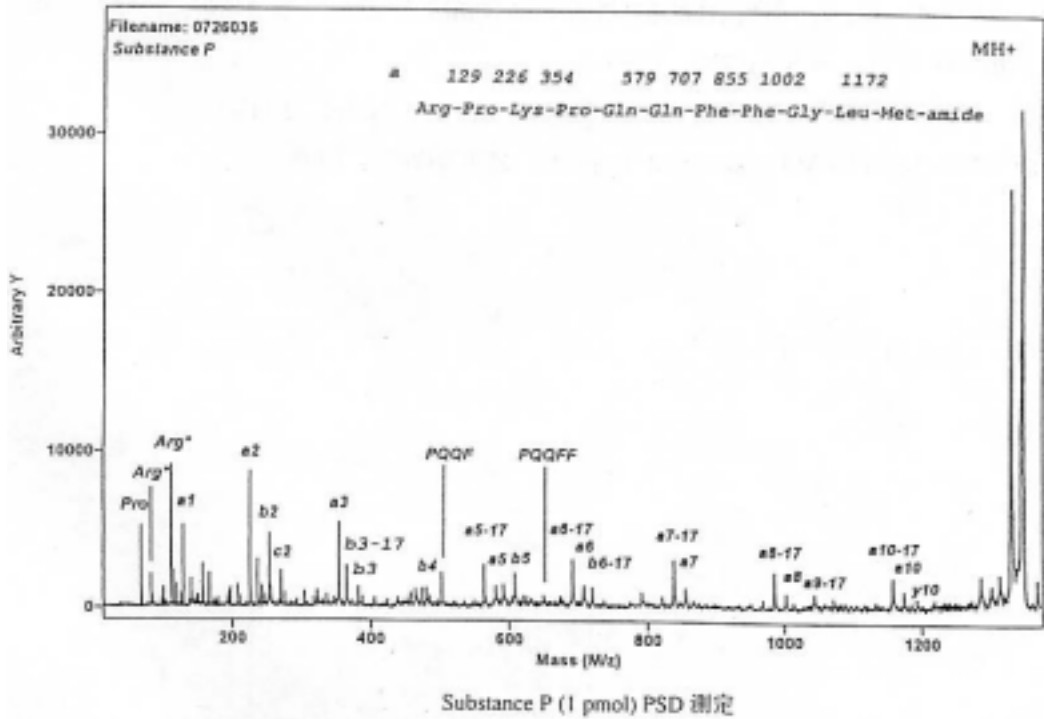


図3. MS/MS 測定例

不純物と Na、K を含む Substance P からタイムダイオンセクタ<sup>3)</sup>により  $MH^+$  のみを分離し、リフレクタによる PSD を組み合わせることで MS/MS 測定が可能となった例。

## 補足説明

1) PSD: 自由飛行中に起きるイオンのメタステーブル分解をいう。

2) CID: collision - induced dissociation

衝突活性化によって起こったフラグメンテーションをいう。ハイ・エネルギーCIDによれば、メタステーブル分解しにくいために PSD 法では、十分な情報が得られない化合物からも多くの構造情報を得ることができる。

3) タイムダイオンセレクタ: リフレクタの入口に設けられた一対のデフレクタ電極。プロダクトイオンは、その運動エネルギーによってのみ選別されている。このため、試料が混合物であるとその各々の分子イオンから PSD によって生成したプロダクトイオンが全て同時に検出されてしまうので、リフレクタ入口でイオンを選別してこの問題を解決するためのもの。

## 参考文献

- ・丹羽利光編著、「最新のマススペクトロメトリー」化学同人、1995
- ・土屋正彦ら編、「質量分析法の親展開」(現代化学・増刊 15) 東京化学同人、1990
- ・J. R. CHAPAN 著、「有機質量分析法」丸善、1995
- ・青田和夫ら編、「バイオ高性能機器導入・共同利用マニュアル」共立出版、1995
- ・田中耕一、ぶんせき、p.253、1996
- ・「MALDI-TOF の基礎と応用」(JEOL Application Note)、1995
- ・「MALDI-TOFMS Technica IReport」(島津製作所)、1996



# トピックス

## 一酸化窒素 (NO) 除去剤 PTIO による生体内 NO の測定

工学部応用物質化学科 片山佳樹

### 1. はじめに

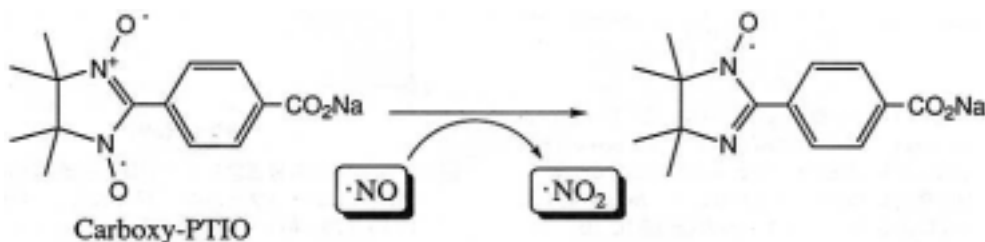
一酸化窒素 (以下 NO と略す) は、合成酵素 (NOS) により生体内で合成され、血管弛緩、神経伝達、生体防御等を始め、極めて多彩且つ重要な役割を演じる情報伝達物質である。しかも、他の多くのメッセンジャーと異なり、レセプターを介さずにシグナル伝達を行い、化学的に活性で多くの化学反応を引き起こし、それにより生じる多くの生成物が NO の多彩な生物活性の原因であるなど、非常にユニークな生体分子である。そのため、NO の作用機序は謎が多く、現在の医学上の最もホットな研究分野となっている。

最近になって、Stamler らにより NO の redox 状態による活性の調節仮説が提唱され、NO の作用がかなり整理されて来た観があるが、それにより、NO の作用系はそれ自体のみではなく、生体内の還元系 (チオールなど) や、酸化系 (活性酸素など) と化学反応を介して密接にクロストークしていることが浮かび上がり、かえって複雑さを増してきている。

このような NO の理解のためには、何よりも NO そのものを捉え、計測することが重要である。NO は、特に反応性が高く、寿命の短い分子であり、その発生タイムコースやプロフィールが生理作用自体に重要な意味を有することは想像に難くない。実際、神経伝達物質放出や、ホルモン分泌に関する NO の作用において、その発生プロフィールが異なると、結果が全く異なることが指摘されている。その様な検知から、様々な NO の計測法が研究されているが、ここでは、NO 除去剤である PTIO 誘導体を用い、ESR を利用した NO の計測法をご紹介します。

### 2. PTIO 誘導体による NO の定量と、リポソーム封入型 PTIO

PTIO(2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide)誘導体は、安定な有機ラジカルであるが、1:1 の化学量論で NO と迅速に反応してこれを NO<sub>2</sub> ラジカルに変換し、自らも別のラジカルである PTI 誘導体に変化する。以下に、Carboxy-PTIO を例にその反応式



を示す。生体内で NO から派生する全ての関連物質を消去してしまう NOS の阻害剤と異なり、NO という化学種のみを選択的に消去できる薬剤として、PTIO 誘導体は薬理的にも有用な化合物である。

一方、PTIO はそれ自身が有機ラジカルであるから ESR により検出可能で、特徴的な 5 重線のシグナルを有する。これが NO と反応すると、全くパターンの異なる ESR シグナルを有する PTI 誘導体となる。従って、このシグナル変化を利用し、PTIO の減少量、PTI の増加量を測定すれば、これらの変化は、1 分子につき 1 分子の NO が関与した訳であるから、直接 NO の定量が可能となる。図 1 に Carboxy - PTIO と PTI、及び NO 発生剤 NOC - 12 から発生する NO によるスペクトルの経時変化を示す。この 1 番左端の PTIO に由来するピークは PTI のそれと重ならない

ため、このピークの減少量から PTIO の消費量、すなわち NO の消費量の算出が可能である。NO の検出には現在、cyclic GMP レベルの測定や、オキシヘモグロビンによるスペクトルの測定、オゾン酸化を利用した化学発光法、NO 最終生成物である  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  の比色・蛍光定量など幾つかの方法がなされているが、どれも間接的であったり、選択性に欠けたりする。鉄錯体を利用した EPR 法による NO の検出は、常磁性である NO の性質を利用した直接的な検出法であり、幾つかの NO トラッピング剤が用いられているが、錯体の安

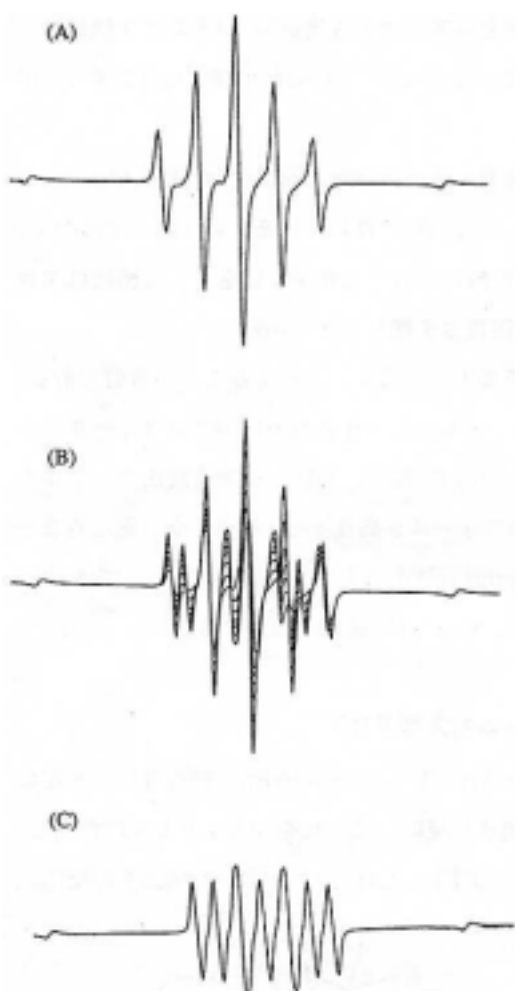


図1 pH 7.4リン酸バッファ中、37℃における carboxy-PTIO (200 $\mu\text{M}$ ) と carboxy-PTI (200 $\mu\text{M}$ ) の ESR シグナル (A および C) 及び、NO 発生剤 NOC-12 (100 $\mu\text{M}$ ) から発生する NO による ESR スペクトルの経時変化 (B)

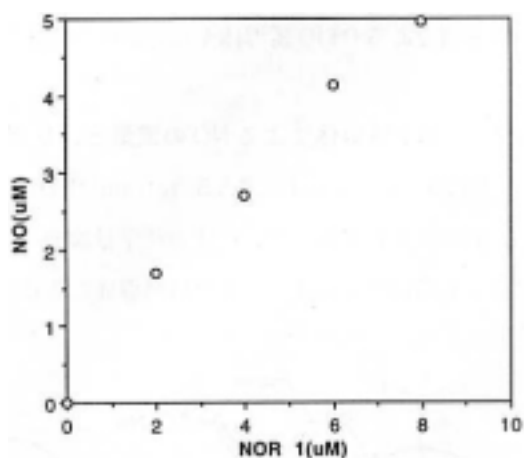


図2 NOR1 の各種濃度による NO 発生量測定例 pH7.4PBS バッファ中、37℃にて Carboxy-PTIO (15 $\mu\text{M}$ ) を用いて測定。

定性が低い欠点もある。PTIO も NO トラッパーとして原理的には使用できる。しかも、PTIO 法では、NO 標準液によるキャリブレーションなしに NO の絶対量が求まることが最大のメリットである。

図 2 に自発的 NO 発生剤 NOR1 の濃度による NO 発生量の違いを Carboxy - PTIO で測定して作成した検量線を示す。この様に、PTIO を用いれば、容易かつ正確に NO 量を求めることができる。

PTIO と NO の反応は速いので、図 3 に示すように、NO 発生源からの放出タイムコースも測定することができる。

この様に、NO 測定に優れた性質を示す PTIO 誘導体であるが、還元剤により可逆的に還元され、ラジカルを消失して (PTIOH 生成) NO との反応性を失うという致命的な欠陥がある。図 4 に各種還元剤での Carboxy - PTIO 由来の ESR シグナルの消失過程を示す。特にアスコルビン酸による還元は極めて迅速で、この事が PTIO の NO 測定への応用を妨げていた。Azu - ma らは、内皮細胞から発生す

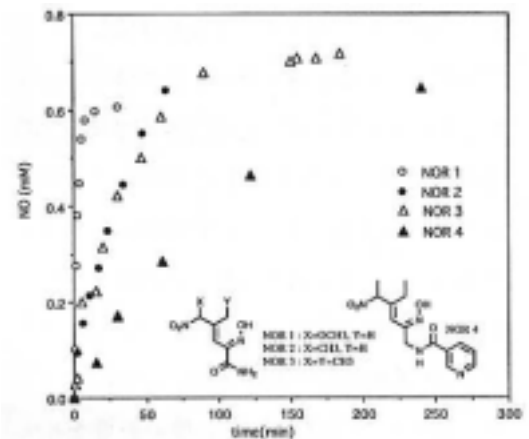


図 3 各種 NOR からの NO 発生タイムコース測定例  
pH7.4PBS バッファー中、37℃にて各種 NOR (0.3mM) から発生する NO を Carboxy-PTIO (0.5mM) を用いて測定。

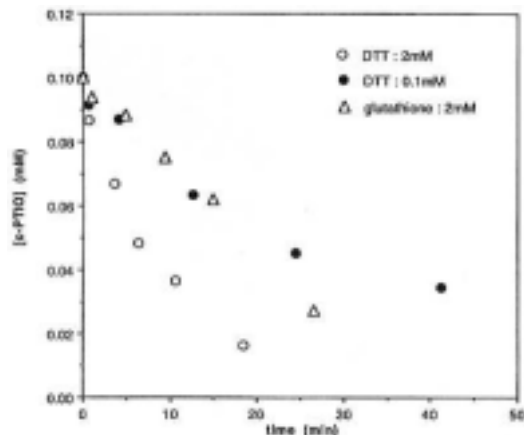


図 4 還元剤による Carboxy-PTIO シグナル消失タイムコース  
pH7.4PBS バッファー中、37℃にて Carboxy-PTIO (100µM) に DTT (ジチオスレイトール 2mM、100µM) 及び、グルタチオン (2mM) を添加して、ESR シグナルの消失量を測定。

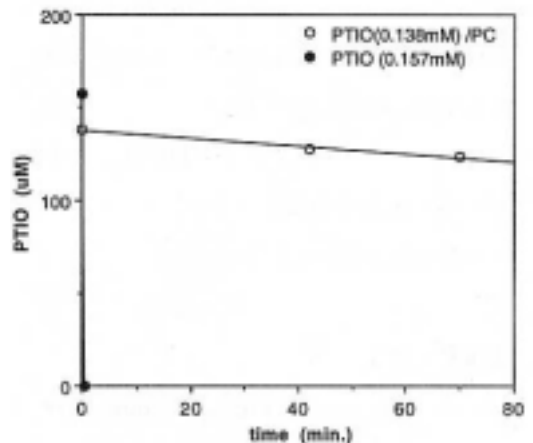


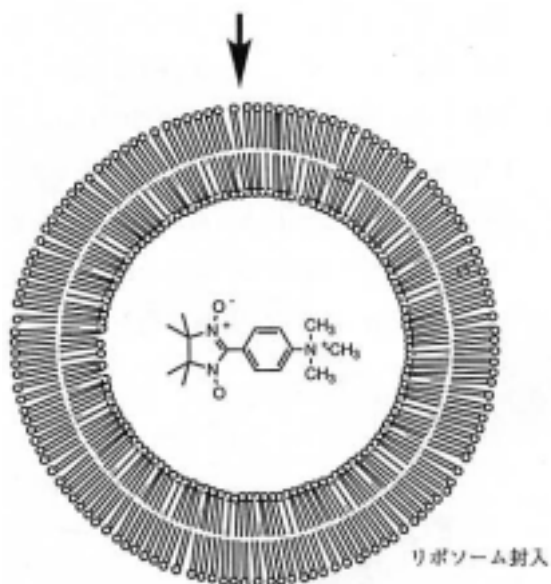
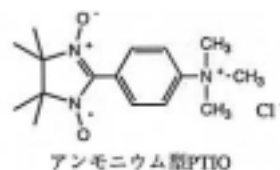
図 5 アンモニウム型 PTIO 及び、これをリポソーム封入したものであるアルコールビン酸による還元タイムコース  
pH7.4PBS バッファー中、37℃にてトリメチルアンモニウム PTIO (157µM) とリポソーム封入後 (138µM) にアルコールビン酸 (1mM) を添加して ESR シグナルの消失を測定。

る NO を Carboxy - PTIO で測定するに当たって、マイクロキャリアビーズに培養した内皮細胞をカラムに充填し、これからの流出液に Carboxy - PTIO を作用させることで還元物質との接触を防いでいる<sup>1)</sup>。この場合、検出下限は Carboxy - PTIO を 500  $\mu\text{M}$  使用時で  $\text{NO} 0.97 \mu\text{M}$  であり、ブラジキニン 3~300nM 刺激で用量依存性に NO 放出量の増加が見られたという。

PTIO の欠点を克服するためには、PTIO 誘導体を還元剤と接触しないように工夫した薬剤を調製すればよい、2 分子膜リポソームはサイズも小さく、このような目的のために有用である。まず、ホファチジルコリンにより作成したリポソームに Carboxy - PTIO の封入を試みたが、表面に吸着してしまい還元剤の影響を排除できな

かった。そこで、逆に正荷電を有する PTIO 誘導体であるトリメチルアンモニウム型の PTIO (下図) を合成し、これを先のユニラメラ型リポソームに封入したところ良好な性質を有する事が分かった。図 5 にアンモニウム PTIO リポソーム封入の有無による ESR シグナル消失へのアスコルビン酸の影響を示した。このリポソーム封入型 PTIO は、生体サンプルからの NO の測定剤として非常にすぐれた性能を有し、熊本大学の赤池らは、これをもちいて、LPS (内毒素) 刺激により活性化した好中球から発生する NO を良好に測定することに成功している<sup>2)</sup>。

今後、リポソーム封入型 PTIO は、生体内 NO、特に細胞や組織切片での NO の測定に貢献することが期待される。



#### 【参考文献】

- 1) T. Azuma, K. Fujii, O. Yuge. Life. Sci. 54, 185 (1994).
- 2) 赤池孝幸、前田浩、私信

## お 知 ら せ

### 1. 新設装置の紹介

- (1) 装置名 : 島津製作所 / KRATOS 製  
                  AXIS - 165 線光電子分光表面分析装置 (ESCA)
- (2) 設置場所 : 中央分析センター (筑紫地区) 103 号室
- (3) 仕様

本体の試料準備室に高真空下 in situ で試料の加熱・冷却やガス反応が行える特別仕様の前処理室が組み込まれており、本体は試料分析室、試料準備室および試料導入室の3室より構成されています。

#### 1) エネルギーアナライザー部

- タイプ : 同心半球電場型 (HSA)  
軌道半径 : 165mm  
検出器 : マルチチャンネルトロン (8チャンネル)

#### 2) エネルギー

- 走査範囲 : 50 - 3200eV (静電 - XPS)  
                  10 - 1500eV (磁気 - XPS)  
分解能 : 25meV  
パスエネルギー : 5 - 320eV

#### 3) アノード線源

- アノード : Mg, Al  
エネルギー範囲 : 0 - 15kV  
電 力 : 最大 450W (30mA、15kV)

#### 4) 線モノクロメーター

- ローランド円 : 500mm  
エネルギー範囲 : 0 - 15kV  
電 力 : 最大 450W (30mA、15kV)

#### 5) エッチングイオン銃

- 型 式 : 差動排気型  
イオン源 : 電子衝撃型、Ar ガス  
加速電圧 : 500 - 5kV  
最小ビーム径 : 125  $\mu$ m

#### 6) 真空排気系

- 220 1/s イオンポンプ (試料分析室)  
チタンサブレーションポンプ (試料分析室)  
220 1/s ターボポンプ + RP (試料準備室)

56 1/s ターボポンプ ( 試料導入室 )

到達真空度 :  $5 \times 10^{-10}$ Torr ( 試料分析室イオンゲージ )

#### 7) 試料ハンドリング

試料ステージ : X Y Z ステージ

試料サイズ : 最大 15mm × 4mm

移動範囲 : , - 10 ~ + 15mm ; Y ± 10mm ; Z ± 10mm ( 垂直方向 );  
, ± 90 ° ( 軸回り )

#### 8) 試料準備室内加熱・冷却装置

試料加熱温度 : 最高 600

試料冷却温度 : 最低 - 130

#### 9) データ処理装置システム

ホストコンピューター : SUN 32bit ワークステーション、メモリ 16MB

OS : UNIX、マルチウィンドウシステム

プリンター : カラーインクジェットプリンター

外部記憶装置 : 3.5 インチ FD ドライブ ( MS - DOS 変換も可能 )  
150MB テープドライブ

オンライン処理 : 装置制御、ステータス表示、リアルタイム表示、ラインスペシ  
フィケーション、マッピング機能、マルチポイント分析など

オフライン処理 : スムージング、バックグラウンド補正、スペクトル演算、定量計  
算、デプスプロファイル、デコンボリューション、カーブフィ  
ッティング機能など

尚、装置本体とは別に試料加熱・冷却用チャンバー ( 仕様は上記に準ずる ) があり、オー  
ジェ電子分光装置、JMP - 7800F ( 104 号室に設置 ) との間の互換測定をサポートするトラ  
ンスファーベッセルが追加される予定。

(4) 利用料金 : 一件当たり 5,000 円、教官が操作

## 2 . 講習会報告

(1) 線光電子分光表面分析装置 ( AXIS - 165 ) 取り扱い説明会を 9 月 10 日 ( 火 ) と 11 日 ( 水 )  
の 2 日間午前 10 時から午後 5 時まで、センター ( 筑紫地区 ) にて行いました。参加人数は  
約 15 名でした。

## 3 . 利用料金の変更

諸事情により、下記の装置の利用料金に変更となりました。ご協力をお願いします。

レーザーラマン分光光度計

管理講座 : 応化 ( 機能 ) 機能物質工学講座

利用料金 : 4,000 円 / 時間