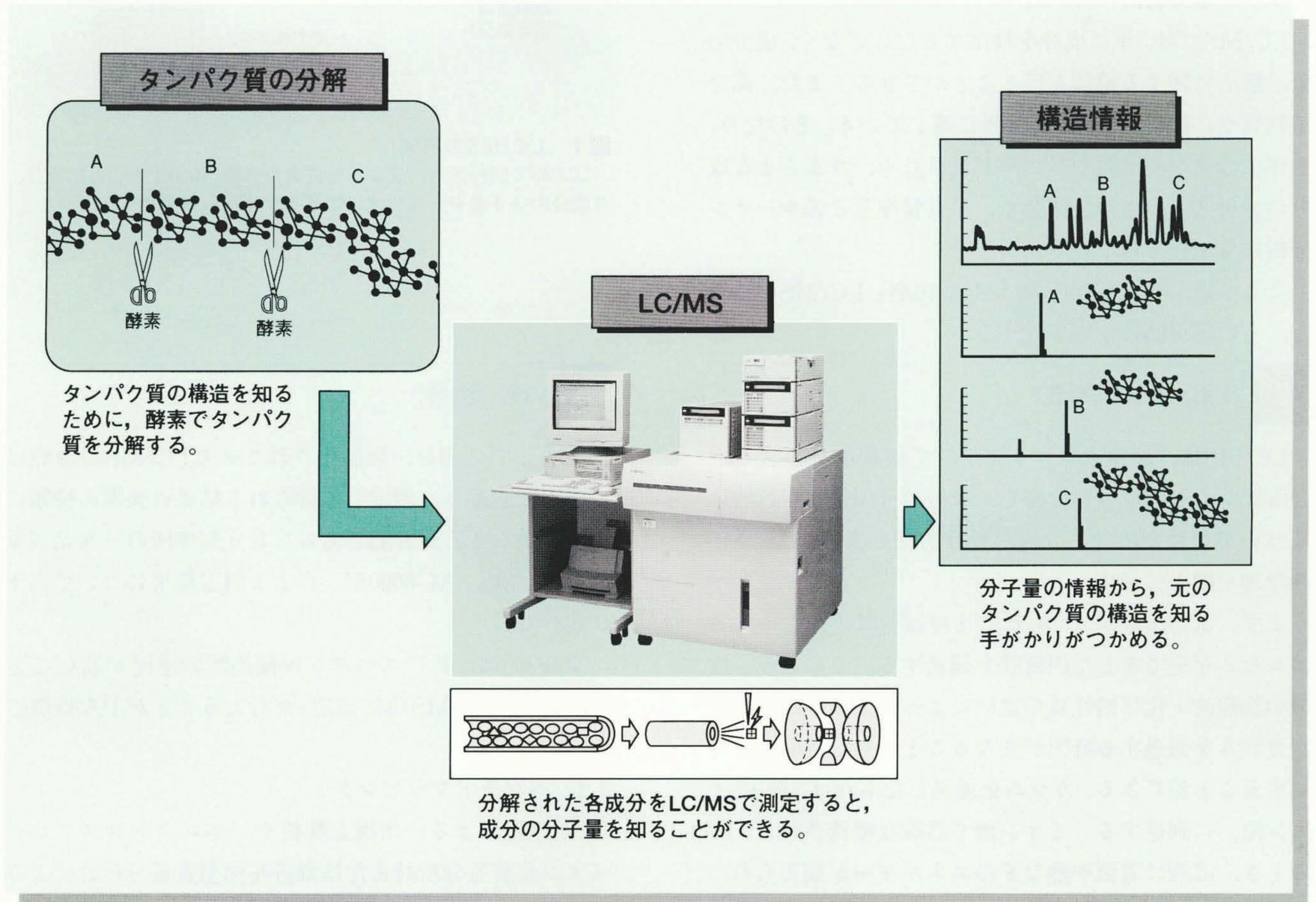


LC/MSによる生体微量成分の分析

Trace Analysis of Organisms by Liquid Chromatograph/Mass Spectrometer

伊藤 伸也 *Shin'ya Itô* 平林 集 *Atsumu Hirabayashi*
吉岡 信二 *Shinji Yoshioka* 平林由紀子 *Yukiko Hirabayashi*



タンパク質の一次構造解析

LC/MSを用いると、各成分の分子量情報が得られるので、反応の結果で得られる未知生成物の同定に威力を発揮する。

生体中の微量成分を正確に測定するには、高感度であることだけでなく、他の成分と識別して目的の成分だけを測定することが要求される。この点で現在注目されているのが、LC/MS(Liquid Chromatograph/Mass Spectrometer：液体クロマトグラフ・質量分析計)である。

LC/MSを用いることにより、混合成分の中から目的の成分を分離し、識別して検出するとともに、成分の分子構造に関する情報を得ることができる。従来法に比べて測定時に試料に大きな熱エネルギーを与えないため、生体中に存在する高分子物質や、不揮発性物質の分析に

適している。最近では、生体中のタンパク質やペプチドをはじめ、さまざまな成分の分析法として、研究開発だけでなく、ルーチン分析にも用いられている。

日立製作所は、1997年に、特徴的なイオン源を搭載し、分子構造情報の取得が可能なタイプの「M-8000形」LC/MSを製品化した。M-8000は、(1)スペクトル検出時の感度が高いことと、(2)ある特定成分にエネルギーを与えて開裂させ、その結果得られたイオンを検出する「MS/MS測定」が行えることを主な特徴としている。

1 はじめに

生体中に微量にしか存在しない成分を正確に検出するには、機器が高感度であることだけでなく、他の成分と識別して検出するための選択性の高さが重要である。この点で現在注目されているのがLC/MS(Liquid Chromatograph/Mass Spectrometer:液体クロマトグラフ・質量分析計)である。

LC/MSでは、単に成分を検出するだけでなく、成分の分子構造に関する情報を得ることができる。また、高分子物質や、不揮発性物質の分析に適している。そのため、生体中のタンパク質やペプチドをはじめ、さまざまな成分の分析法として研究開発や、品質管理などのルーチン分析にも用いられている。

ここでは、日立製作所の「M-8000形」LC/MSの特徴と、その応用例について述べる。

2 LC/MSの原理

LC/MSは、液体クロマトグラフで複数成分を含む混合溶液から目的成分を分離し、成分の分子量(質量数)に基づいて質量分析計で分析を行う方法である。LC/MSの原理を図1に示す。

まず、試料溶液が、「カラム」と呼ばれる内部にシリカゲルなどを充てんした円筒管を通過する。このとき、成分の物理的・化学的性質の違いによって溶液中の各成分がカラムを通過する時間が異なることから、各成分を分離することができる。カラムを通過した溶液は、順次「イオン源」に到達する。イオン源で溶液は噴霧される。このとき、溶液に電気や熱などのエネルギーが加えられ、それによって溶液中の成分がイオン化される。イオンとなった成分は、真空容器内に配置された「質量分析部」に導入される。質量分析部には電場または磁場などが形成しており、その中でイオンは質量数と電荷の比に応じて分離され、検出される。

LC/MSでは、イオン生成時に成分に与えられるエネルギーは小さく、成分分子に水素イオンが付加した擬分子イオン $[M+H]^+$ の形で検出されることが多い。その結果、得られるマススペクトルから、成分の分子量情報が得られる。試料中に複数の成分が検出された場合には、その成分が既知であれば、それぞれのマススペクトルから各成分を決定することが容易である。また、未知成分であったとしても、その成分が何であるかを知る手がかりになる。

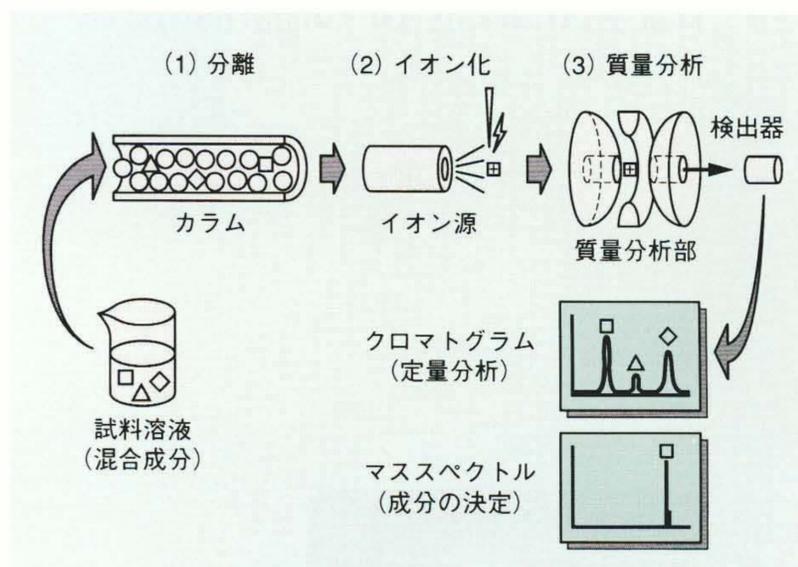


図1 LC/MSの原理

LC/MSで試料溶液に含まれる成分を分離、検出することにより、各成分の分子量や分子構造に関する情報が取得できる。

3 測定例

現在までに開発、製品化されているLC/MSの種類はさまざまであり、測定して得られる結果は装置の種類によって異なるのが普通である。日立製作所の三次元四重極型LC/MS「M-8000形」による測定結果について以下に述べる。

M-8000は、特にスペクトル検出時の感度が高いことと、後述する「MS/MS測定」が行えることが主な特徴である。

3.1 ペプチドマッピング¹⁾

LC/MSによる一次構造解析や、エレクトロスプレーイオン化質量分析計または飛行時間型質量分析計による分子量決定など、特に1990年以降のタンパク質の研究で、質量分析計が占める割合は大きくなっている。タンパク質の一次構造を解析する手段として、タンパク質を酵素消化して得られるペプチド混合物を液体クロマトグラフや、LC/MS、電気泳動などで測定し、分布の様子(ペプチドマッピング)を調べる方法がある。このときにLC/MSを用いると、各ペプチドの保持時間と質量情報(分子量)の二つが同時に得られるので、非常に有効である。

チトクロム-Cを酵素(トリプシン)で消化して得られたペプチド混合物のクロマトグラムと、ピーク4と5のマススペクトルを図2に示す。試料は酢酸アンモニウム溶液でpH=7.8に調整後、35°Cで24時間酵素消化したものである。クロマトグラムで検出された各ピークは、マススペクトルからその分子量を知ることができる。酵素

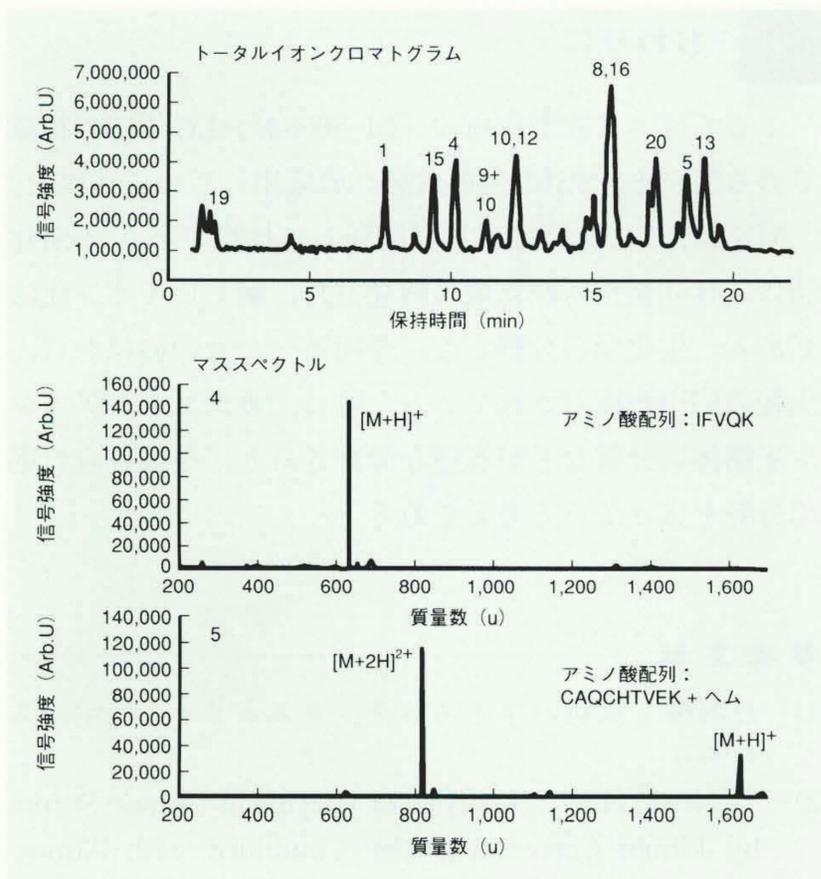


図2 チトクロム-Cのペプチドマッピング
得られるマスペクトルから、ペプチド混合物の分子量が確認できる。

消化で得られたペプチドの分子量と、生成されたイオンをまとめたものを表1に示す。同表で示すように、分子量の小さな断片を除いた各成分ピークが検出されている。

3.2 MS/MS(MSⁿ)による構造解析

MS/MSとは、ある特定成分のイオンにエネルギーを与えて開裂させ、その結果得られたイオンを検出する方法である。M-8000では、MS/MSを複数回繰り返すことにより、開裂をより促進させること(MSⁿ)が可能である。MSⁿを用いたペプチドの構造解析について以下に述べる。

生理活性ペプチドであるアンギオテンシンⅢのMSⁿスペクトルを図3に示す。同図上段のMSスペクトルでは成分の擬分子イオンが検出されており、分子量決定に役立つ。この擬分子イオンにエネルギーを与えて、イオンを開裂させた後に検出した結果が、中段のMS/MSスペクトルである。アンギオテンシンⅢのC末端から、アミノ酸残基が開裂したピークが数本検出されている。ここで最も信号強度の大きい質量数の成分を取り出してエネルギーを与え、イオンを開裂させた結果が下段のMS/MS/MS(MS³)スペクトルである。中段のスペクトルよりもさらに開裂が進んだスペクトルが検出されており、より詳細な情報を得ることができる。

このようにMS/MSは、成分の構造解析に利用される

表1 チトクロム-Cのトリプシン消化で生成される断片の配列

アミノ酸配列から予想されるペプチドの多くが検出されている。

アミノ酸配列	分子量	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺
GDVEK	588.3	589.3	—
GK	203.3	204.3	—
K	146.2	147.2	—
IFVQK	633.8	634.8	—
CAQCHTVEK+ヘム	1,634.7	1,635.7	818.4
GGK	260.3	261.3	—
HK	283.3	284.3	—
TGPNLHGLFGR	1,168.4	1,169.4	585.2
K	146.2	147.2	—
TGQAPGFTYTDANK	1,470.6	1,471.6	736.3
NK	260.3	261.3	—
GITWK	603.7	604.7	—
EETLMEYLENPK	1,495.5	1,496.5	—
K	146.2	147.2	—
YIPGTK	677.8	678.8	—
MIFAGIK	779.0	780.0	—
K	146.2	147.2	—
K	146.2	147.2	—
TER	404.4	405.4	—
EDLIAYLK	964.1	965.1	—
K	146.2	147.2	—
ATNE	433.4	434.4	—

注：□ (今回検出されたもの)

ほか、成分の同定能力を向上させたり、混合成分の微量分析にも応用されるなど、LC/MSの持つ長所をさらに高める機能と言える。最近ではMS/MS機能を持つ装置も広く普及しており、今後のLC/MSの発展を左右する機能であることはまちがいないものとする。

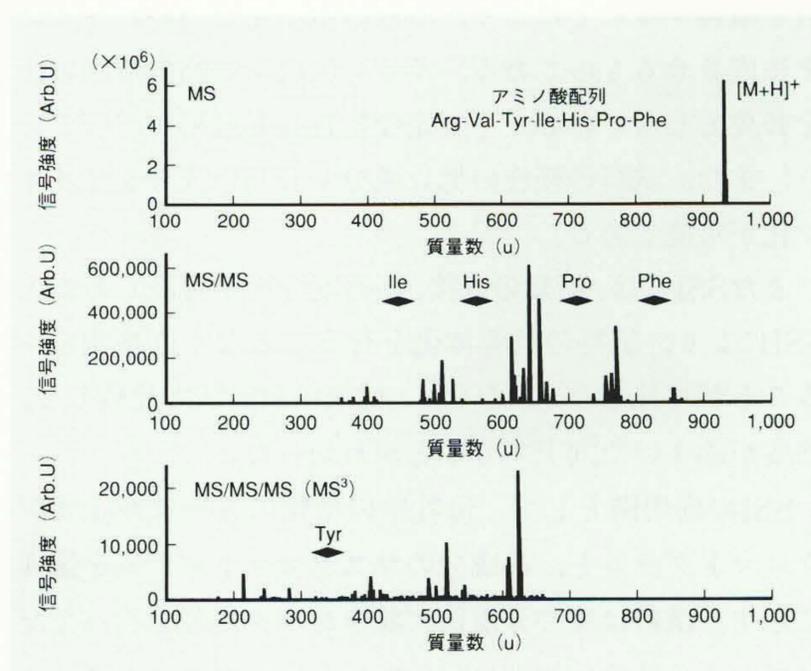


図3 アンギオテンシンⅢのMSⁿスペクトル
MS/MSとMS³により、順番から外れたアミノ酸が観測されている。

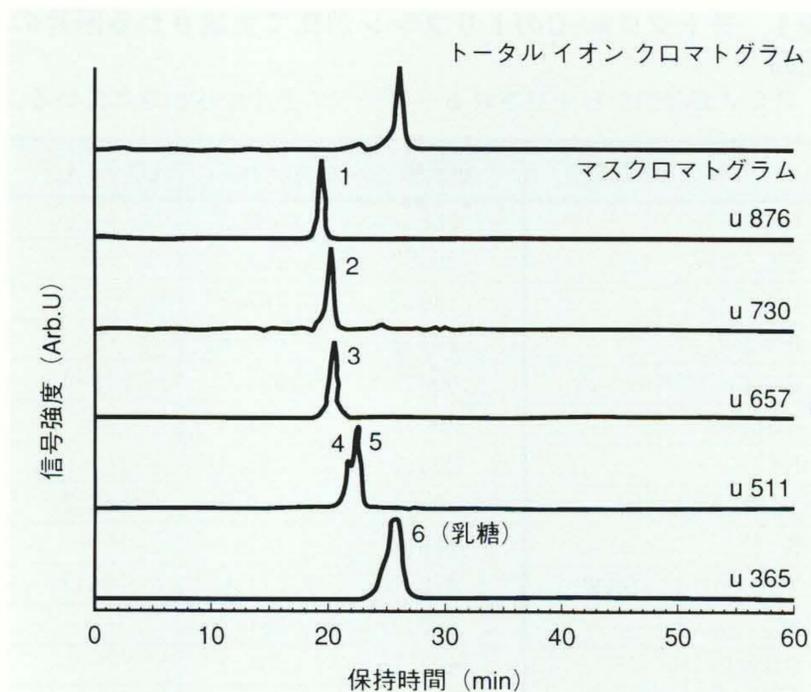


図4 母乳中の糖類分析

乳糖(ラクトース)をはじめとする母乳中のオリゴ糖が直接、高感度に検出されている。

3.3 生体中の糖類の分析

生体中の糖質は、グルコースなどの単糖がエネルギー代謝にかかわり、また、多糖が骨格物質や代謝産物であるなど、生体中で重要な役割を果たしている²⁾。

現在、糖類の分析に用いられる分析法としてGC(Gas Chromatography)/MSやHPLC(High Performance Liquid Chromatography)などがあるが、試料の誘導体化が必要で時間がかかったり、感度や選択性に問題があるなど、必ずしも最適な分析法であるとは言えない。

日立製作所は、イオン化法としてSSI(Sonic Spray Ionization)³⁾を開発した。これは、音速のガス流で試料溶液を噴霧することにより、溶液の微細化と同時にイオンを生成させるものである。イオン生成時に高熱や高電圧を必要としないので、不安定な物質にも適応が可能であり、また、試料の極性の低い成分から高い成分までイオン化が可能である。

またSSIでは、糖類の直接、高感度分析が可能である⁴⁾。SSIにより、試料の誘導体化を行うことなく直接測定することが可能となり、さらに、従来の測定法と比較して、感度が約1けた向上することがわかった。

SSIの応用例として、母乳中の糖類のトータルイオンクロマトグラムと、各成分のマスククロマトグラムを図4に示す。試料は遠心分離後に除タンパク処理を行っただけで、その他の前処理は行っていない。クロマトグラムからは、多量に存在する乳糖(ラクトース)だけでなく、その他5種の微量のオリゴ糖が検出されている。

4 おわりに

ここでは、日立製作所の「M-8000形」LC/MSの特徴であるMSⁿと、SSIの生体成分への応用について述べた。

MSⁿは、この分野では比較的新しい技術であり、SSI化法は、日立製作所が新規に開発した、新しいイオン化法である。生化学の分野でも、今回述べたもののほかに、広範の応用が検討されている。特に、カテコールアミンや配糖体の分析などが有望な分野であり、今後さらに応用分野を広げていく考えである。

参考文献

- 1) 丹羽編：最新のマススペクトロメトリー，化学同人(1995)
- 2) T. Niwa, et al.: Analysis of Polyols in Uremic Serum by Liquid Chromatography Combined with Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography*, 613, 9(1993)
- 3) A. Hirabayashi, et al.: Sonic Spray Ionization Method for Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 66, 4557(1994)
- 4) 石川, 外: LC/MSを用いた糖類の分析, *Separation Sciences '98講演要旨集*, 119(1998)

執筆者紹介



伊藤 伸也

1995年日立製作所入社，計測器事業部 環境システム本部 設計部 所属
現在，質量分析計のアプリケーション開発に従事
日本分析化学会会員
E-mail: ito_s@cm.naka.hitachi.co.jp



吉岡 信二

1996年株式会社日立サイエンスシステムズ入社，テクノリサーチセンタ 分析医用研究部 所属
現在，質量分析計，LC/MSの拡販業務に従事
日本分析化学会会員
E-mail: yoshioka_hs@cm.naka.hitachi.co.jp



平林 集

1987年日立製作所入社，中央研究所 メディカルシステム研究部 所属
現在，質量分析，環境分析関連技術の研究開発に従事
工学博士
日本物理学会会員，日本化学会会員，日本分析化学会会員，日本質量分析学会会員，原子衝突研究協会会員
E-mail: hirabaya@crl.hitachi.co.jp



平林由紀子

1992年日立製作所入社，中央研究所 メディカルシステム研究部 所属
現在，質量分析技術の研究開発に従事
日本分析化学会会員，クロマトグラフィー科学会会員，応用物理学会会員，日本エム・イー学会会員，日本生物物理学会会員
E-mail: hiraby@crl.hitachi.co.jp