

技術論文

キャピラリー電気泳動/質量分析法による脳機能関連物質の分析

高田 安章^{®*}, 吉田 基子^{*}, 坂 入 実^{*}, 小泉 英明^{*}

(1994 年 9 月 6 日受付)

(1994 年 11 月 30 日審査終了)

キャピラリー電気泳動/質量分析法 (CE/MS) による神経伝達物質や脳内ペプチドなどの脳機能関連物質分析の可能性について、特に感度面から検討した。エレクトロスプレーイオン化 (ESI) インタフェースを有する CE/MS により神経伝達物質や脳内ペプチドといった脳機能関連物質の検出感度を評価したところ、カテコールアミンの感度が劣るものの (約 100 fmol), γ -アミノ酪酸 (約 10 fmol) や脳内ペプチド (1~0.1 fmol) は高感度で検出された。CE の分離能力と MS の同定能力を合わせ持つ CE/MS は、類似物質が多い脳内物質の分析に有効であると考えられる。

1 緒 言

近年、脳機能計測への関心が高まっており、非侵襲画像計測 (機能 MRI, 光 CT, 脳磁計測など) と脳内物質分析の両面から研究が進められている。著者らは化学分析の立場から脳機能計測の可能性を検討している。脳内の代謝機能などを物質レベルで解析するためには、極めて多くの成分中から目的とする物質を確実にとらえることや、速い代謝動向をモニターできる時間分解能の高い計測法の開発などが課題となる。これらの課題を克服するためには、極微量の混合試料を分析できる物質同定能力の優れた計測技術が必要となる。そこで、神経伝達物質などの脳内物質の分析に対し、キャピラリー電気泳動 (CE: capillary electrophoresis)・質量分析計 (MS: mass spectrometer) 結合装置 (CE/MS) の適応を検討した。CE は混合試料を高速高分離能で分離できるため^{1)~3)}、多成分分析に威力を発揮するとともに、極微量試料を扱えるという特長からサンプリング時に生体へ与える負荷が少なく、サンプリングの間隔を短縮することにより時間分解能の向上も可能であると考えられる。CE の課題には、分離再現性が液体クロマトグラフィーなどに比べて若干劣るため、泳動時間だけで物質を同定することが困難であることや、試料が微量であり、分離した各成分を分取することが困難であることなどが挙げ

られる。そこで、CE と定性能力の優れた検出法との結合が重要視されており、CE/MS への期待が高まっている^{4)~7)}。今回、CE/MS により脳機能関連物質を分析する試みの第一歩として、神経伝達物質や脳内ペプチドなどをエレクトロスプレーイオン化 (ESI) インタフェースを有する CE/MS により分析し、脳機能関連物質の検出感度を評価した。

2 実 験

2・1 紫外吸光検出法

CE における神経伝達物質の分離条件を見いだすため、ウォーターズ製 Q-4000 型 CE 装置を用い、紫外 (UV) 吸光検出法により検討した。内径 75 μm , 外径 375 μm , 長さ 60 cm (有効長 52.5 cm) のキャピラリーを用い、波長 214 nm, 185 nm による UV 吸収法で検出した。緩衝溶液は 15 mM 酢酸アンモニウム (50% アセトニトリル, pH: 4.5, 7.8) を用いた。緩衝溶液の pH の調整は酢酸により行った。電気泳動のための印加電圧は 20 kV とした。試料導入は落差法を用い (10 cm, 10 秒), 試料の導入量は約 10 nl とした。

2・2 インタフェース

CE/MS の実験に用いた CE 装置及び CE と MS とのインタフェース部分は自作した⁶⁾⁷⁾。インタフェースの概略を Fig. 1 に示す。キャピラリー (内径 25 μm 又は 50 μm , 外径 150 μm , 長さ 40 cm) の一端を外径

* (株)日立製作所中央研究所: 185 東京都国分寺市東恋ヶ窪 1-280

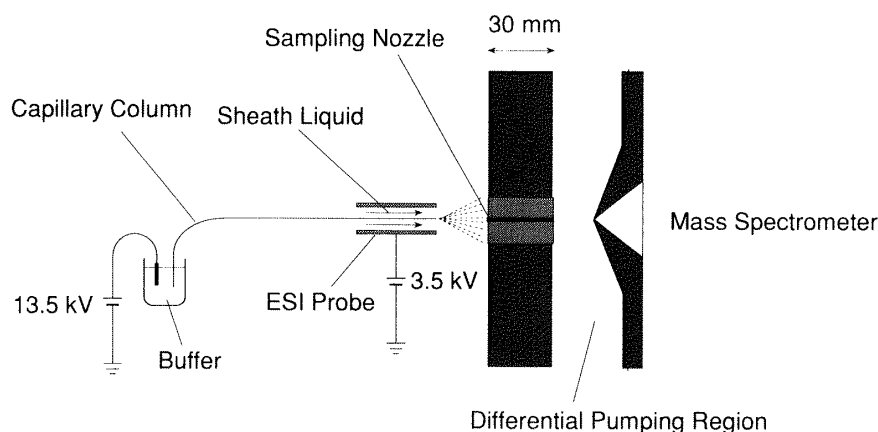


Fig. 1 Schematic diagram of the CE/MS interface

400 μm の噴霧用ステンレス鋼管に挿入した。キャピラリーの他の端は緩衝溶液槽内に保持した。緩衝溶液は 15 mM 酢酸アンモニウム (50% アセトニトリル, pH4.5) 又はこれに 20 mM のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を添加した溶液を用いた。電気泳動のための印加電圧は 10 kV とした。試料導入は落差法を用いた。噴霧用ステンレス鋼管と第一細孔の開口する電極との間に約 3.5 kV の電圧を印加し、溶液を静電噴霧させることにより試料のプロトン付加擬分子イオンを生成した。シースフローとして 1% ギ酸を含む 50% メタノール溶液を流量 1~3 $\mu\text{l}/\text{min}$ で用いた⁸⁾。シースフローとは、電気浸透流によりキャピラリーの末端から送られて来る緩衝溶液の流量 (0~0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$) と、静電噴霧を安定に持続できる流量 (数 $\mu\text{l}/\text{min}$) とを整合させるために、キャピラリーと噴霧用ステンレス鋼管との間に導入される噴霧補助溶液のことである。

2・3 質量分析計

MS は日立 M-1000 型を独自に改造して使用した⁹⁾¹⁰⁾。噴霧により生成された帯電液滴は内径 250 μm 、長さ 30 mm の第一細孔を通して差動排気部に取り込まれる。第一細孔温度は約 120°C とした。液滴は加熱された第一細孔を通過する際に気化が促進される。第一細孔と第二細孔の間には 70 V のドリフト電圧を印加し、スキマー衝突解離 (CID) 法により溶媒とクラスターイオンの脱溶媒を行った¹¹⁾。第二細孔から真空中に取り込まれたイオンは四重極型質量分析部により質量分離される。第二細孔と質量分析部との間にはノイズ除去効果のある二重円筒静電レンズを使用した¹⁰⁾。イオンの検出には選択イオンモニタリング (SIM) あるいは

多重イオン検出 (MID) モードを用いた。

2・4 試料

試料としたドーパミン (略号: DA), エピネフリン (E), ノルエピネフリン (NE), Leu-エンケファリン, [Gly]Leu-エンケファリン, [Gly]Met-エンケファリン, 還元型グルタチオン (GSH), 酸化型グルタチオン (GSSG), ウリジン, セロトニン (5-HT), メラトニン, ホモバニリン酸 (HVA), 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC), アスパラギン酸 (Asp), グルタミン酸 (Glu), γ -アミノ酪酸 (GABA), アセチルコリン (ACh), アンギオテンシン-II, アンギオテンシン-III, ニューロテンシンは米国シグマ製を購入した。

3 結果及び考察

3・1 CE/MS のための分離条件の検討

MS 以外の検出器を用いる場合、CE の緩衝溶液には高濃度のナトリウム塩などが添加される場合が多い。しかし、これらの緩衝溶液は ESI インタフェースを有する CE/MS では使用が困難である。これは、塩に由来するイオンが溶液中に大量に存在すると、イオン源において分析対象とするイオンの気相への抽出効率が低下するためである¹²⁾¹³⁾。MS 検出には酢酸アンモニウムなどのアンモニウム塩がよく用いられる。これは、塩に由来するアンモニウムイオンがプロトン親和力の強い試料分子にプロトンを供給することができるためである。ESI は主に極性の高い物質を測定対象としているため、アンモニウムイオンの存在は分析上大きな障害とはならない。

そこで、CE/MS で使用可能な酢酸アンモニウム緩衝

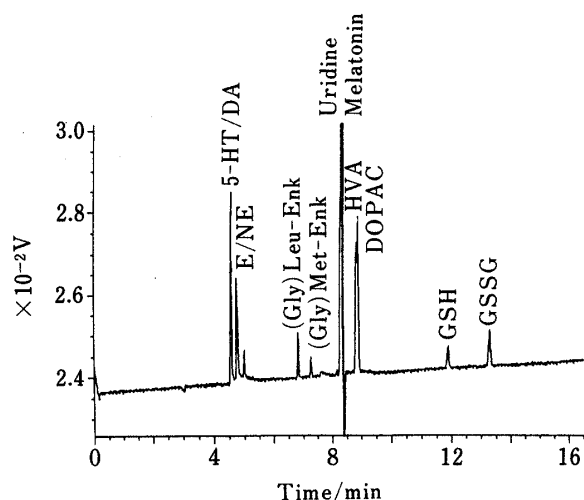


Fig. 2 Electropherogram of substances related to brain function

Capillary: 75 μm i.d., 60 cm long; Buffer solution: 30 mM ammonium acetate/acetonitrile (50/50), pH 4.5; UV wavelength: 214 nm; Sample concentration: 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Injection volume: 10 nl

溶液を用いた場合の脳機能関連物質の分離について、評価が容易な市販の CE 装置により予備検討を行った。まず、緩衝溶液の pH と分離再現性について評価した。CE/MS では、イオン強度は緩衝溶液の pH に依存する¹⁴⁾。今回、試料分子にプロトンが付加した陽イオンを観測するモード（ポジティブモード）を用いるため、緩衝溶液は弱酸性が望ましい。しかし、緩衝溶液の pH を低くするとペプチドなどの試料がキャピラリー内壁面に吸着し、分離再現性を悪くするおそれがある⁶⁾。そこで、pH 4.5 と pH 7.8 の緩衝溶液を用いて予備検討を行ったが、再現性に有為な差は見られなかった。このため、以下の実験において、pH 4.5 の緩衝溶液を用いた。

試料を UV 吸収特性に応じて二つに分類し、波長 214 nm と 185 nm を用いて分析した。Fig. 2 は波長 214 nm にて検出が可能な物質 (DA, E, NE, エンケファリン類, GSH, GSSG, ウリジン, 5-HT, メラトニン, HVA, DOPAC) のエレクトロフェログラムである。12 成分が九つのピークに分離された。又、アミノ酸などは標識した後に分析する方法が一般的であるが、標識した物質は移動度に変化してしまう。そこで、波長 214 nm では検出が困難な成分 (Asp, Glu, GABA, ACh) に対し、より短波長の 185 nm を用いて分析を試みた。Fig. 3 にエレクトロフェログラムを示す。ACh と

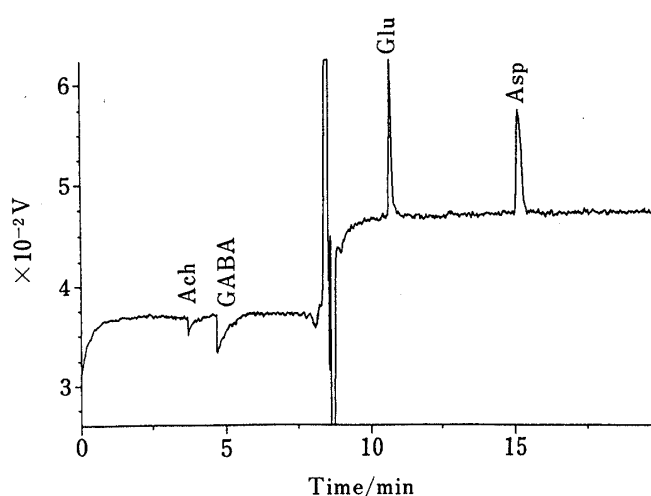


Fig. 3 Electropherogram of substances related to brain function

Capillary: 75 μm i.d., 60 cm long; Buffer solution: 30 mM ammonium acetate/acetonitrile (50/50), pH 4.5; UV wavelength: 185 nm; Sample concentration: 0.50 mg/ml; Injection volume: 10 nl

GABA は間接吸光度法で検出されたが、これは試料分子の吸光度が緩衝溶液中のアセトニトリルの吸光度に比べて少ないためと考えられる。以上に示すように、酢酸アンモニウム緩衝溶液により、一部分離が不十分な成分があるものの (E と NE など)、主要な脳機能関連物質をおおむね分離できることが確認された。

3・2 CE/MS による脳機能関連物質の分析

脳内には極めて多くの成分が含まれるため、脳内物質を分析する装置には化学的構造の異なる物質を同時に分析できるはん用性が求められるとともに、化学的構造の類似した物質を明確に見分ける高い同定能力が要求される。エンケファリン, ウリジン, DA, GABA を混合した試料を CE/MS により分析した結果を Fig. 4 に示す。電気泳動緩衝溶液は前節で検討した 15 mM 酢酸アンモニウム (50% アセトニトリル, pH 4.5) を用いた。各々の試料にプロトン付加した一価イオンが検出されることが期待されたが、ペプチド以外にもヌクレオチド, カテコールアミン, アミノ酸などの化学的構造の異なる物質が、同時に検出できることが分かった。

次に、化学的構造が似た物質の分析例として、カテコールアミン 3 成分 (DA, NE, E) の分析を行った。Fig. 2 に示したように、酢酸アンモニウム緩衝溶液を用

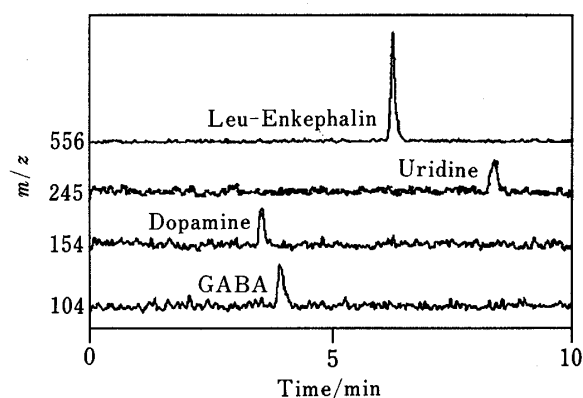


Fig. 4 Mass electropherograms of substances related to brain function (γ -aminobutyric acid, Dopamine, Uridine, and Leu-Enkephalin) using CE/MS. Capillary: 50 μm i.d., 40 cm long; Buffer solution: 30 mM ammonium acetate/acetonitrile (50/50), pH 4.5; Sample concentration: 0.5 mM; Injection volume: 3 nl

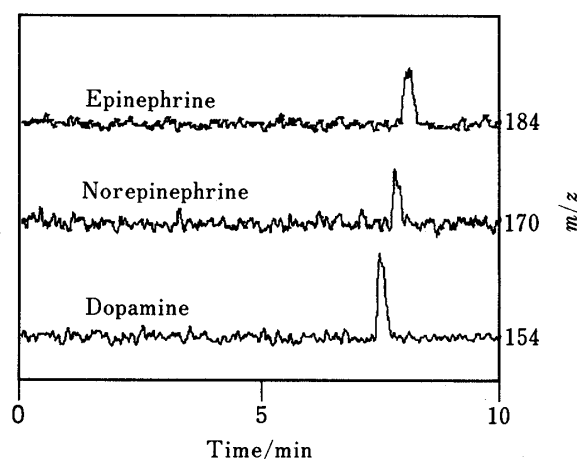
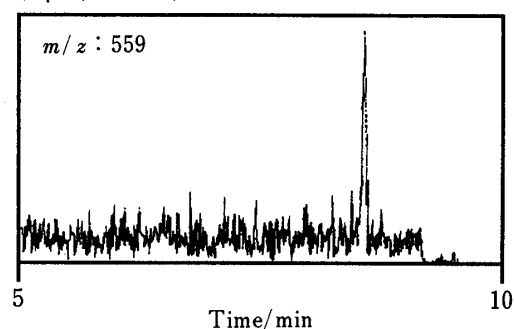


Fig. 5 Mass electropherograms of catecholamines using CE/MS

Capillary: 25 μm i.d., 40 cm long; Buffer solution: 30 mM ammonium acetate/acetonitrile (50/50) with 20 mM sodium dodecyl sulfate; Sample concentration: 3 mM; Injection volume: 0.2 nl

いた場合、電気的な泳動速度の差だけでは NE と E との分離が困難である。そこで、酢酸アンモニウム緩衝溶液に 20 mM の SDS を加え、試料分子と SDS ミセルとの相互作用の差により物質を分離するミセル導電キャピラリクロマトグラフィーと MS との結合を試みた。前述のように、SDS に由来するナトリウムイオンが大

(a) Neurotensin
(1 μM , 3 fmol)



(b) Epinephrine
(100 μM , 100 fmol)

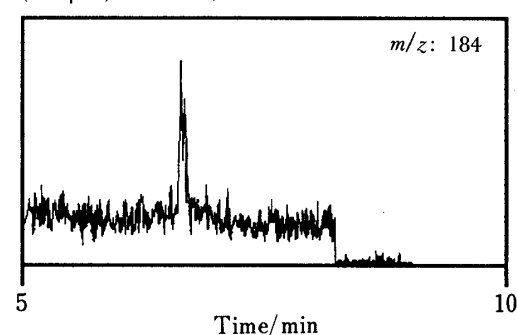


Fig. 6 Analysis of (a) neurotensin, and (b) epinephrine using CE/MS

Capillary: 50 μm i.d., 40 cm long; Buffer solution: 30 mM ammonium acetate/acetonitrile (50/50), pH 4.5; Sample concentration: (a), 1 μM ; (b), 100 μM ; Injection volume: (a), 3 nl; (b), 1 nl

量にイオン源に送られると試料のイオン化が阻害されるため、内径 25 μm の細いキャピラリーを用いた。結果を Fig. 5 に示す。3 成分が分離されるのと同時に、得られるイオンの質量の差異から、構造のよく似たカテコールアミン類 3 成分が明確に識別された。ミセル導電キャピラリクロマトグラフィーは、電気泳動では分離できない中性物質を分離する手段として知られ¹⁵⁾、MS 検出との組み合わせが期待されている⁴⁾。Fig. 5 に示した結果から、界面活性剤が含まれる緩衝溶液を CE/MS に使用できることが明らかとなり、ミセル導電キャピラリクロマトグラフィーと MS との直結の可能性が示された。

3.3 検出感度

ESI インタフェースを有する CE/MS の検出感度はキャピラリーの内径に依存し、キャピラリー内径が細い

Table 1 Detection limits for neurotransmitters and brain peptides using CE/MS ($S/N \approx 2$)

Compound	detection limits	
	μM	fmol
Dopamine, Epinephrine, Norepinephrine	100	100
Uridine, Glutathione (oxidized-, reduced-) γ -Aminobutyric acid	10	10
Leu-Enkephalin Angiotensin(-II, III) Neurotensin	1~0.1	1~0.1

ほど感度が向上することが知られている¹³⁾。ここでは、内径 50 μm のキャピラリーを用いて感度を評価した結果を示す。緩衝溶液は 15 mM 酢酸アンモニウム (50% アセトニトリル, pH 4.5), シースフローは 1% ギ酸を含む 50% メタノール溶液を流量 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ で用いた。Fig. 6(a) は脳内ペプチドであるニューロテンシンを 3 fmol (試料濃度 1 μM , 導入量約 3 nl) 導入し分析した結果であるが、プロトン付加した三価イオンが検出された (ニューロテンシンは二価イオンも同時に検出された)。又, Fig. 6(b) はエピネファリンを分析した結果であるが, 100 fmol (100 μM , 約 1 nl) でイオンが検出された。Table 1 に、本装置を用いた場合の検出感度を示す ($S/N \approx 2$)。今回、試料導入を手動で行ったため導入量にばらつきがあり、検出感度の厳密な評価は困難である。そこで、表中にはオーダーを記載した。Table 1 から、カテコールアミンの感度が劣るものの (約 100 fmol)、脳内ペプチドは高感度で検出できることが分かった (1~0.1 fmol)。この感度の差は、ESI によるイオン化効率の差に依存している。又、GABA など比較的感度良く (約 10 fmol) 検出できることが分かった。GABA などのアミノ酸は神経伝達物質や脳内の代謝物質として重要な働きをするが、強い UV 吸収を持たないなどの理由により、無標識の高感度検出は難しい。CE/MS は、アミノ酸にも高い感度を有していることから、脳内物質の分析に有効であると考えられる。

脳内物質のサンプリングには、医学等の分野で用いられるマイクロダイアリシス (MD: microdialysis) が有

効である¹⁶⁾。これは、透析膜のついた微小プローブを脳内に埋め込み、脳局所から放出される物質を回収する方法である。MD と CE/MS との組み合わせは、脳内の代謝反応などを物質レベルで解明していく上で一つの重要な手段となることが期待される。脳内の濃度¹⁷⁾や MD による回収率を考慮すると、GABA など幾つかの物質は MD で回収したサンプル中から直接 CE/MS により検出することができると考えられ、現在検討を行っている。

本研究を行うに当たり、脳内物質について医学的見地から御教示いただきました東京医科歯科大学医工器研究部 菰田泰夫、本多和樹両先生に感謝致します。

(1994 年 6 月, 第 55 回分析化学)
討論会にて一部発表

文 献

- 1) W. G. Kuhr: *Anal. Chem.*, **62**, 403R (1990).
- 2) 寺部 茂: ぶんせき, **1994**, 281.
- 3) 真鍋 敬: ぶんせき, **1994**, 467.
- 4) W. M. A. Niessen, U. R. Tjaden, J. Greef: *J. Chromatogr.*, **636**, 3 (1993).
- 5) R. D. Smith, J. H. Wahl, D. R. Goodlett, S. A. Hofstadler: *Anal. Chem.*, **65**, 574A (1993).
- 6) Y. Takada, K. Nakayama, M. Yoshida, M. Sakairi: *Anal. Sci.*, **10**, 713 (1994).
- 7) Y. Takada, K. Nakayama, M. Yoshida, M. Sakairi: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 695 (1994).
- 8) R. D. Smith, C. J. Barinaga, H. R. Udseth: *Anal. Chem.*, **60**, 1948 (1988).
- 9) 高田安章, 坂入 実, 神原秀記: 1992 年度質量分析連合討論会講演要旨集, p. 18 (1992).
- 10) 高田安章, 坂入 実, 小泉英明, 小瀬洋一, 吉成清美: 1994 年度質量分析連合討論会講演要旨集, p. 180 (1994).
- 11) M. Sakairi, H. Kambara: *Anal. Chem.*, **60**, 774 (1988).
- 12) L. Tang, P. Kebarle: *Anal. Chem.*, **63**, 2709 (1991).
- 13) J. H. Wahl, D. R. Goodlett, H. R. Udseth, R. D. Smith: *Electrophoresis*, **14**, 448 (1993).
- 14) M. A. Moseley, J. W. Jorgenson, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, K. B. Tomer: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **3**, 289 (1992).
- 15) 寺部 茂: 生化学, **64**, 111 (1992).
- 16) 渡辺裕司: 生体の科学, **44**, 153 (1993).
- 17) 奥山典生, 笠川 立: “化学の領域 (増刊)”, **133**, pp. 57~77 (1981), (南江堂).



Analysis of substances related to brain function using capillary electrophoresis/MS. Yasuaki TAKADA, Motoko YOSHIDA, Minoru SAKAIRI and Hideaki KOIZUMI (Central Research Laboratory, Hitachi Ltd., 1-280, Higashikoigakubo, Kokubunji-shi, Tokyo 185)

Substances related to brain function (neurotransmitters and brain peptides) were analyzed by capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE/MS). An ammonium acetate buffer, commonly used for CE/MS with an electrospray interface, was used to separate the substances. Micellar electrokinetic capillary chromatography/mass spectrometry was also used to analyze catecholamines (Dopamine, Epinephrine, Norepinephrine). The detection limits were about 100 fmol for catecholamines, 10 fmol for some other substances (GABA, uridine and glutathione), and 0.1~1 fmol for brain peptides, when using a 50 μ m i.d. analytical capillary column. We believe CE/MS will be a useful technique for analyzing brain substances, because of its characteristics of high separation efficiency, small sample consumption, and high identification ability.

(Received September 6, 1994)

(Accepted November 30, 1994)

Keyword phrases

capillary electrophoresis/mass spectrometry; electrospray; neurotransmitter; brain peptide.
