

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550101

研究課題名(和文) 大気中での水素ラジカル関与の特異な反応の基礎研究

研究課題名(英文) The study of specific reactions of hydrogen radical under ambient conditions

研究代表者

高山 光男 (Takayama, Mitsuo)

横浜市立大学・その他の研究科・教授

研究者番号：10328635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：大気中での水素ラジカルの反応特性を調べるために、水素ラジカル発生装置を製作しその評価を行った。装置は、水素ガスを満たすための反応管と水素ガスを解離するための紫外光源から構成され、水素ラジカル発生を確認するために、大気圧コロナ放電イオン源を結合した質量分析計を用いた。検出された生成物はフッ化水素FHのクラスターとそのフッ素イオンF-付加体であると推定された。フッ化水素の生成を確認できたことから、本研究で製作した装置は、実験安全面で優れた水素ラジカル発生システムとして利用可能であることが実証された。

研究成果の概要(英文)：To examine the reaction characteristics of hydrogen radicals under ambient conditions, we have made a generator of hydrogen radicals and estimated its performance. The hydrogen radical generator consists of a reaction cell of hydrogen gas and an ultraviolet lamp of 160-400nm (3.8-7.7eV) in wavelength. The generation of hydrogen fluoride (HF) was confirmed with a mass spectrometer combined with an atmospheric pressure corona discharged ionization source. The mass spectrum showed the peaks corresponding to negative cluster ions F-(HF)_n originating from the reactions of hydrogen radicals with Teflon wall of the reaction cell.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：水素ラジカル

1. 研究開始当初の背景

本研究は、平成 18～19 年度および平成 20～22 年度の基盤研究課題である、水素ラジカルによる特異な分解反応とその基礎・応用研究の成果を背景としている。すなわち、真空中および水溶液中での水素ラジカル発生とそのタンパク質主鎖への結合と特異的開裂反応を見だし、アミノ酸配列解析へ応用できたことである。本研究成果を背景に、これまで、さらに大気気体環境中で水素ラジカルを発生させ、大気中での水素ラジカル関与の反応系の探索および酸化反応に対抗する実用的な反応の探索を進めることを指向してきた。

2. 研究の目的

水溶液中および真空中での水素ラジカル関与の特異な化学反応の成果に基づき、大気中での水素ラジカル関与の反応過程を解明するために、水素ラジカル発生システムを構築し、その性能を評価すると同時に反応機構の解明を目的とする。また、水素ラジカル発生を評価するための水素化反応等を伴う標準反応系の探索確立も目的とする。

3. 研究の方法

これまでの水溶液中および真空中での水素ラジカル発生を考慮し、大気中での水素ラジカル生成には紫外光電子励起を利用する。紫外光には種々波長のランプを用い、波長と水素ラジカル発生試薬の組み合わせを見つけ出すと同時に、安全性を考慮した水素分子ガス発生装置も積極的に利用する。水素ラジカルの発生評価には、本研究室で開発した大気圧コロナ放電イオン化 (APCDI) 質量分析 (MS) および反応解析にはマトリクス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) MS を利用する。APCDI MS を使う場合、試料は大気空間中に設置また浮遊させるだけで良い。大気中でのイオン化反応は、正イオンでは水クラスターイオンからのプロトン移動反応である (図 1)。

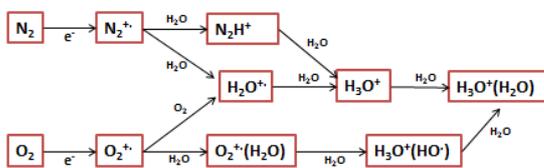


図 1 大気圧コロナ放電イオン化法の反応イオン

4. 研究成果

(1) 水素ラジカル発生装置の開発準備。水素ラジカル発生試薬には、当初、サリチル酸系有機化合物を利用する予定であったが、環境対策を考慮し、電解水素ガス発生器を利用することとした。真空紫外光による水素ガス分解により、水素ラジカルを発生させることとした。しかし、水素ラジカル発生を評価し得る反応系は知られていないため、先ず、類

似のシステムとして、酸素ガスからのオゾン発生装置の構築を目指した。その結果、反応管中に封入した酸素気体に紫外ランプを照射し、酸素原子からのオゾンの発生を確認した。その発生速度は 60micro-mol/sec であった。その際、使用した紫外光の波長は 160-400nm (3.8-7.7 eV) で、酸素分子の解離エネルギー (5.1eV) より大きいため、有意な量のオゾンが生成したと考えられる (図 2)。

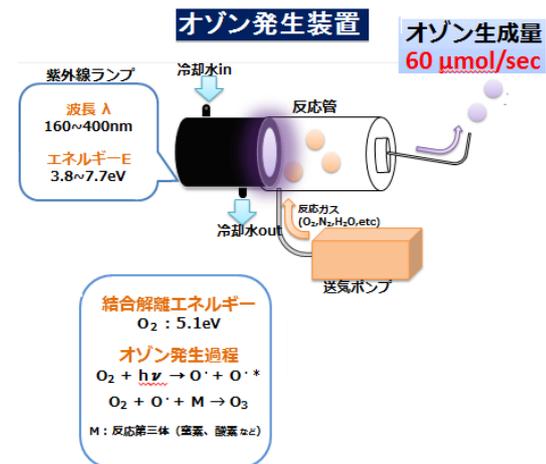


図 2 水素ラジカル発生のためのオゾン発生予備システム

生成した気体オゾンによる酸化反応を確認するために、酸性性アミノ酸を含むペプチド (SYSMEHFRWGKPVGKRRPVKVYP) を水溶液中でオゾン进行バブリングすることで、酸化反応を起こさせた。反応後のペプチド試料を MALDI-MS で解析した結果、ペプチド試料に酸素が 3 個付加したピークが観測され、さらに 6 個から 9 個付加したピークも観測された (図 3)。本ペプチドには、酸化性の芳香族アミノ酸であるチロシン Y、メチオニン M、トリプトファン W、フェニルアラニン F が含まれており、それらのうちいずれかが単一または複数部位酸化されたと考えられるが、詳細な酸化部位の解析は今後の課題である。ペプチド試料の酸化反応の確認は、本オゾン発生装置の原理である紫外光による酸素の原子化反応が、酸化反応に供する有意な濃度でオゾンを発生させることを証明した (図 2)。従って、本システムを利用することで、水素ラジカルを発生する原理的基礎を整えることができた。

(2) 水素ラジカル発生装置。準備した反応管中でのオゾン生成が確認できたため、反応管中へ電解水素ガスを導入した。水素ラジカル発生を確認するために、大気圧下で作動するコロナ放電イオン源により、反応生成物を検出した。得られた生成物はフッ化水素 FH のクラスターとそのフッ素イオン F-付加体であると推定された。すなわち、反応管の材料としてテフロンを利用したため、生成した水

SYSMEHFRWGPVGGKRRPVKVYP

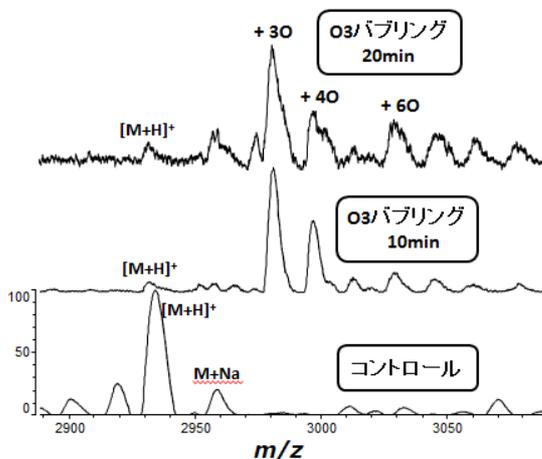


図3 ペプチドのオゾン酸化マスペクトル。オゾン照射なしではプロトン付加試料 $[M+H]^+$ が観測され、オゾン照射後は酸素付加体のイオンピークが観測された。

素ラジカルが反応管の壁面と衝突し、壁面のフッ素原子を引き抜きフッ化水素が生成したと考えられる。また、他の有機分子との反応生成物の検出を試みたが、明確な水素化反応が起こること実証するには至っていない。この理由として、反応管中での水素分子への紫外光照射によって生成する水素ラジカルの反応挙動が明確で無いことがあげられる。すなわち、生成した水素ラジカルが反応管中の残留気体である酸素や窒素と室温で衝突相互作用する際の水素化反応が不明確であること、および生成する水素ラジカルの濃度を評価できる方法が無いことなどがあげられる。

また、関連する現象として、大気中に浮遊させたフェニルアラニンおよびその同族体を APCDIMS で計測したところ、水素引き抜き反応が観測された。本反応は、大気中でラジカル種が生成し、そのラジカル種によって気相フェニルアラニンからの水素引き抜きが生じたと考えられるが、水素ラジカルとの関連は不明であり、今後の解決課題となった。

(3) 今後の課題。フッ化水素の生成を確認できたことから、本研究で製作した装置は、実験安全面で優れた水素ラジカル発生システムとして利用可能であることが実証された。しかし、水素化反応および水素ラジカルの関与する特異な反応の研究に利用するためには、生成した水素ラジカルの大気中での濃度と寿命、および水素ラジカルの反応管表面との相互作用など、詳細な研究が必要である。さらに、極めて透過性の高く反応性も高いと考えられる水素ラジカルを空間中に維持し、反応空間まで移送するための反応管材料の選択も課題として考えられる。以上の課題が解決されることで、水素ラジカルの反応性を

精確に調べる実験系の構築が可能になると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

K. Sekimoto, M. Sakakura, T. Kawamukai, H. Hike, T. Shiota, F. Usui, Y. Bando and M. Takayama, Ionization characteristics of amino acids in direct analysis in real time mass spectrometry, *Analyst*, 査読有, 139 (2014) 2589-2599.

R. Imuro and M. Takayama, Analysis of flexibility of proteins by means of positive and negative ion MALDI in-source decay mass spectrometry, *Mass Spectrom (Tokyo)*, 査読有, 2014; DOI: 10.5702/massspectrometry.S0023. M. Takayama, S. Sekiya, R. Imuro, S. Iwamoto, and K. Tanaka, Selective and Nonselective Cleavages in Positive and Negative CID of the Fragments generated from In-Source Decay of Intact Proteins in MALDI-MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom (Tokyo)*, 査読有, 25 (2014)120-131.

D. Asakawa, M. Sakakura, and M. Takayama, Influence of Initial Velocity of Analytes on In-source Decay Products in MALDI Mass Spectrometry using Salicylic Acid Derivative Matrices, *Int. J. Mass Spectrom.*, 査読有, 337 (2013)29-33. K. Sekimoto, N. Matsuda, M. Takayama, Collision-induced dissociation study of the adduct ions produced in NO_3^- -free area of atmospheric pressure negative corona discharges under ambient air conditions, *Mass Spectrom (Tokyo)*, 査読有, DOI: 10.5702/massspectrometry.A0020. (2013).

K. Sekimoto and M. Takayama, Collision-induced dissociation analysis of negative atmospheric ion adducts in atmospheric pressure corona discharge ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 査読有, 24 (2013) 780-788.

I. Osaka, M. Sakai and M. Takayama, 5-Amino-1-naphthol, a novel 1,5-naphthalene derivative matrix suitable for MALDI in-source decay of phosphorylated peptides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 査読有, 27 (2013)103-108.

〔学会発表〕(計2件)

松田菜津季、関本奏子、高山光男：
大気圧下での負イオン付加体の生成と水
素引き抜き反応、第61回質量分析総合討
論会(つくば, 9月)2013.9.10-12. ポス
ター発表

三船千佳、関本奏子、高山光男：大
気イオン生成に与えるオゾンの影響、第6
1回質量分析総合討論会(つくば, 9月)
2013.9.10-12. ポスター発表

〔図書〕(計1件)

高山光男 他編、化学同人、現代質
量分析学、2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://masspecs.sci.yokohama-cu.ac.jp>

/
6. 研究組織
(1)研究代表者
高山 光男(TAKAYAMA, Mitsuo)
横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科
学研究科・教授
研究者番号：10328635

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：