

同程度の生成が認められた。これらの結果から、ONOO<sup>-</sup>によって引き起こされる DNA の損傷を評価するためには dG のニトロ化物である NO<sub>2</sub>Gua と酸化物である 8-OHdG の 2 つの修飾塩基を評価する必要があることを確認した。さらに、これら二つの修飾塩基を一つの DNA 試料から測定可能な評価法の構築を達成した。

## 実験 2

### C-1. NO<sub>2</sub>Trp の同定

Figure 6-A に示したように、反応後の溶液の SIM クロマトグラム ( $m/z$  250) において 3 種のピーク (Peak 1-3) が観察された。同時に得られたそれらのピークの MS スペクトル及び吸収スペクトルの結果、MS スペクトルにおいて 3 種のピークは全てプロトン付加体として  $m/z$  250 を示したが (Fig. 6-B-D), 吸収スペクトルにおける極大吸収はそれぞれ 365, 340 及び 400 nm の異なる値を示した。HPLC による分取、精製によって得られたそれぞれの標準品を用いて、<sup>1</sup>H NMR 測定による解析を行った結果、Peak 1 は 2-NO<sub>2</sub>Trp, Peak 2 は 6-NO<sub>2</sub>Trp 及び Peak 3 は 4-NO<sub>2</sub>Trp であることを確認した。それぞれの芳香環部位における化学シフトとカップリング定数を以下に示す。2-NO<sub>2</sub>Trp (D<sub>2</sub>O with 30 mM NaOD) は H-4 (7.53 ppm, 1H, d,  $J_{4,5} = 8.2$  Hz), H-7 (7.30 ppm, 1H, d,  $J_{6,7} = 8.55$  Hz), H-5 (7.07 ppm, 1H, dd,  $J_{5,6} = 7.6$  Hz,  $J_{4,5} = 8.2$  Hz), H-6 (6.86 ppm, 1H, dd,  $J_{6,7} = 8.55$  Hz,  $J_{5,6} = 7.6$  Hz). 4-NO<sub>2</sub>Trp (D<sub>2</sub>O with 30 mM NaOD) は H-5 (7.64 ppm, 1H, dd,  $J_{5,6} = 7.9$  Hz,  $J_{5,7} = 0.9$  Hz), H-7 (7.55 ppm, 1H, dd,  $J_{5,7} = 0.9$  Hz,  $J_{6,7} = 8.2$  Hz), H-2 (7.21 ppm, 1H, s), H-6 (7.00 ppm, 1H, dd,  $J_{5,6} = 7.9$  Hz,  $J_{5,7} = 8.2$

Hz). 6-NO<sub>2</sub>Trp (CD<sub>3</sub>OD) は H-7 (8.37 ppm, 1H, d,  $J_{5,7} = 1.9$  Hz), H-5 (7.98 ppm, 1H, dd,  $J_{4,5} = 8.8$  Hz,  $J_{5,7} = 1.9$  Hz), H-4 (7.75 ppm, 1H, d,  $J_{4,5} = 8.8$  Hz), H-2 (7.60 ppm, 1H, s) であった。Trp, 2-, 4-及び 6-NO<sub>2</sub>Trp の化学構造を Figure 7 に示す。

### C-2. 測定条件の最適化

MS/MS 測定におけるインターフェイスには ESI を用い、ポジティブイオンモードを採用した。Trp 及び NO<sub>2</sub>Trp 異性体のモニタリングイオンを Table 2 に示す。NO<sub>2</sub>Trp 異性体では MRM スペクトルにおいてそれぞれ異なるフラグメンテーションを起こすことが明らかとなったため、それぞれ最も強いシグナル強度を示した  $m/z$  130,  $m/z$  233 及び  $m/z$  159 を採用することで、それぞれを選択的に検出することが可能と考えた。

移動相の検討では、移動相中に含まれる酸及び塩濃度が MS/MS におけるイオン化の度合いに大きく影響することから、本実験では、移動相に添加する酢酸濃度の検討を行った。酢酸濃度は 0 - 0.1% (v/v) の範囲で検討し、それぞれの濃度における Trp, 2-, 4-及び 6-NO<sub>2</sub>Trp それぞれのピーク強度を比較した結果、すべての物質において酢酸 0.005% のとき最も強いピーク強度が得られたことから、0.005% 酢酸を最適とした。本条件で測定を行った結果、Trp, 2-, 4-及び 6-NO<sub>2</sub>Trp はそれぞれ保持時間 7.0, 8.7, 14.5 及び 12.6 分に検出された。さらに、 $m/z$  250 > 233 の MRM クロマトグラムでは 4-NO<sub>2</sub>Trp と 6-NO<sub>2</sub>Trp 両方のピークが検出されたが、 $m/z$  250 > 130 及び 250 > 159 ではそれぞれ 2-NO<sub>2</sub>Trp 及び 4-NO<sub>2</sub>Trp を選択的に検出することが可能であった。

### C-3. 分析法バリデーション

本分析条件における Trp, 2-, 4-及び 6-NO<sub>2</sub>Trp の定量限界 (S/N = 10) はそれぞれ 4.0, 3.0, 10 及び 4.0 nM で, 検出下限値 (S/N = 3) は 1.2, 1.0, 3.5 及び 1.2 nM であった. また, サロゲート物質を用いた検量線範囲は, 全ての物質において定量限界値から 1000 nM の範囲で良好な直線性 (相関係数 0.999 以上) が得られた. また, Trp, 2-, 4-及び 6-NO<sub>2</sub>Trp それぞれの平均保持時間は 7.27 (R.S.D. = 0.49%, n = 5), 9.15 (R.S.D. = 0.39%, n = 5), 14.97 分 (R.S.D. = 0.59%, n = 5) 及び 12.94 (R.S.D. = 0.34%, n = 5) であった. さらに, ピーク面積の R.S.D. はそれぞれ 2.4, 2.0, 1.4 及び 1.7% であり, 良好な感度及び再現性が得られた. Figure 8 には検出限界及び定量限界値における Trp, 2-, 4-, 6-NO<sub>2</sub>Trp 及びサロゲート物質の MRM クロマトグラムを示す.

Table 3 には, 添加回収試験の結果を示す. マウス肝組織におけるタンパク質の消化液中のブランク値は Trp が 85.4 ± 0.2 nM で NO<sub>2</sub>Trp は全ての異性体において検出限界以下であった. Trp, 2-, 4-及び 6-NO<sub>2</sub>Trp それぞれの標準溶液の添加濃度を低濃度は 250, 25, 50 及び 25 nM とし, 高濃度は 500, 100, 200 及び 100 nM とし回収率を算出した結果, すべてにおいて 96 から 103% の範囲であり, 良好な回収率が得られた.

これらの結果から, Trp, 2-, 4-及び 6-NO<sub>2</sub>Trp のサロゲート物質を用いた高感度, 高精度かつ簡便な分析法の構築を達成した. さらに本法は *in vivo* 試料の測定にも適用できる十分な感度と精度を備えていることを確認した.

### C-4. BSA と ONOO<sup>-</sup> の反応による NO<sub>2</sub>Trp 生成の確認

タンパクと ONOO<sup>-</sup> の反応による NO<sub>2</sub>Trp 異性体生成を確認するため, *in vitro* 実験系において BSA と ONOO<sup>-</sup> を反応させ, 本法を用いて BSA 中に生成する NO<sub>2</sub>Trp 異性体の測定を行った. 様々な濃度の ONOO<sup>-</sup> (0 - 1000 µM) を反応させたときの NO<sub>2</sub>Trp 生成量を Figure 9 に示す. NO<sub>2</sub>Trp 異性体はそれぞれ, BSA のみでは検出されなかったが, ONOO<sup>-</sup> の濃度依存的に生成することを確認した. また, 異性体の生成量は 6-NO<sub>2</sub>Trp, 4-NO<sub>2</sub>Trp 及び 2-NO<sub>2</sub>Trp の順であった. NO<sub>2</sub>Trp についての報告では, その多くが 6-NO<sub>2</sub>Trp であり, 他の異性体についての報告は少ない. しかしながら, 本研究におけるこれらの結果から, RNS による Trp の修飾を評価するには 6-NO<sub>2</sub>Trp 以外の異性体についても評価する必要があることを明らかにした.

### C-5. 生体試料への適用

APAP による肝障害には ROS や RNS が関与していることが知られている<sup>11-14)</sup>.

NO<sub>2</sub>Trp の *in vivo* 試料中での検出例は未だにないが, *in vitro* での実験結果から *in vivo* でも炎症性疾患において NO<sub>2</sub>Tyr 同様, NO<sub>2</sub>Trp 異性体が生成していると考えられる. そこで, *in vivo* における NO<sub>2</sub>Trp 生成と, 本法の *in vivo* 試料測定への適用性を確認するため, APAP を投与したマウス肝組織におけるタンパク質中 NO<sub>2</sub>Trp の測定を行った.

対象群及び APAP 投与後 8 時間群のマウス肝組織におけるタンパク質の標準的な MRM クロマトグラムを Figure 10 に示す.

対象群においては、NO<sub>2</sub>Trp 異性体は全て検出限界以下であったが、APAP 投与後 8 時間では 4-及び 6-NO<sub>2</sub>Trp を検出した。対象群、APAP 投与後 2, 4 及び 8 時間後における 2-, 4-及び 6-NO<sub>2</sub>Trp の測定結果を Table 4 に示す。2-NO<sub>2</sub>Trp は全ての試料において検出限界以下であったが、4-及び 6-NO<sub>2</sub>Trp は APAP 投与群においてそれぞれ 9.03-12.60 及び 26.9-32.7 µmol/mol of Trp の範囲で検出された。さらに、6-NO<sub>2</sub>Trp は APAP 投与後 8 時間群において全ての試料から検出された。このことから、本法は *in vivo* 試料中の NO<sub>2</sub>Trp の測定に適用可能であることを確認した。

#### D. 考察

##### 実験 1

CS-LC-ESI-MS による NO<sub>2</sub>Gua の測定では、グリオキサール誘導体化により NO<sub>2</sub>Gua 極性を低下させ、CS システムを採用することで、オンラインでの試料の精製および濃縮を可能にした。さらに、安定同位体をサロゲート物質として用いることで、高精度な測定法の構築を達成した。その測定感度は検出限界が 1.0 nM、定量限界が 3.0 nM と良好な結果が得られた。また、すでに DNA 中 8-OHdG の測定で広く用いられている DNA 消化法を採用し、LC-UV-ECD による dG および 8-OHdG の測定法を併用することで、一つの DNA 試料から、酸化およびニトロ化の二つの修飾塩基の評価を可能にした。

本法を ONOO<sup>-</sup>を反応させた仔牛胸腺 DNA の分析へ適用した結果、ONOO<sup>-</sup>を添加していない対照群では 8-OHdG のみが検出され、NO<sub>2</sub>Gua は検出されなかったが、高濃度の ONOO<sup>-</sup>では、8-OHdG と NO<sub>2</sub>Gua がほ

ぼ同程度で生成することを明らかにした。これらのことから、ONOO<sup>-</sup>を始めとする RNS による DNA の損傷を評価するには NO<sub>2</sub>Gua だけでなく 8-OHdG も評価する必要がある、これらの修飾塩基の評価は RNS が関連する傷害や発がん機構の解明に極めて有用である。

##### 実験 2

生体内における RNS によって引き起こされる Trp のニトロ化を明らかにすることを目的として、タンパク質中に生成する NO<sub>2</sub>Trp 異性体の高感度分析法を構築した。Trp のニトロ化は種々の異性体を生成することから、2-, 4-及び 6-NO<sub>2</sub>Trp を測定対象物質とし、NO<sub>2</sub>Trp の分析用標準品及びサロゲート物質として用いる <sup>15</sup>N でラベル化された安定同位体の合成を行った。

LC-ESI-MS/MS による測定法は高感度かつ高精度であり、*in vivo* 試料へも十分に適用可能な測定法を構築した。本法を APAP 投与後のマウス肝組織におけるタンパク質中の NO<sub>2</sub>Trp 測定に適用した結果、4-及び 6-NO<sub>2</sub>Trp の検出に成功した。このことは RNS による Trp の修飾を評価するには、6-NO<sub>2</sub>Trp だけでなく他の異性体についても測定する必要性を示している。さらに、APAP の投与によって NO<sub>2</sub>Tyr だけでなく、NO<sub>2</sub>Trp 異性体も生成することを初めて明らかにしたことから、すでに NO<sub>2</sub>Tyr の生成が知られている他の疾病においても NO<sub>2</sub>Trp が生成し、RNS によって引き起こされる様々な障害に関与している可能性が考えられた。また、前処理方法を含め、本法は高感度かつ高精度な測定が可能であることから、他の組織や酵素中の測定にも十分

に適用可能であり、RNSに関連した傷害や発がん等の機構解明に極めて有用である。

#### E. 結論

本研究では、生体内において生成したRNSによって引き起こされるDNAおよびタンパク質のニトロ化の評価法を確立した。

近年、生体内におけるRNSによる酸化ストレスが注目されており、RNSの過剰な生成は結果としてDNAの酸化損傷や脂質の過酸化を引き起こすことが知られている。これらのことから、生体内におけるRNSの生成量を測定することは、RNSと疾患との関係を明らかにするのに極めて重要である。

本年度において構築したニトログアニンおよびニトロトリプトファンの高精度な測定法は未だ報告されておらず、RNSによって引き起こされる新たな障害の機構解明に極めて有用な手段になると考えられる。今後、これらの測定法を用いて、RNSと種々の疾患の関係についてもさらに研究を進めていく必要がある。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究成果

##### G-1. 学会発表

- 1) 石井雄二, 大柄敦資, 梅村隆志, 西川秋佳, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 広瀬雅雄, 中澤裕之, 活性窒素種によるDNA損傷評価法の構築. 第28回日本フリーラジカル学会学集会 (2006年5月・三重)
- 2) Yuji Ishii, Atsushi Ogara, Yusuke

Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Akiyoshi Nishikawa, Masao Hirose, Hiroyuki Nakazawa, Estimation of oxidative DNA damage induced by reactive nitrogen species 20<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2006年6月・Kyoto)

- 3) 石井雄二, 梅村隆志, 岡野圭太, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 西川秋佳, 斉藤貢一, 広瀬雅雄, 中澤裕之, カテコール亜硝酸ナトリウム併用投与によるラット前胃発がん機構の解明. 日本食品化学学会 第12回 総会・学術大会 (2006年6月・名古屋)
- 4) 石井雄二, 大柄敦資, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 梅村隆志, 西川秋佳, 斉藤貢一, 広瀬雅雄, 中澤裕之, 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による生体中ニトロトリプトファンの高感度分析法. 第50回日本薬学会関東支部大会 (2006年10月・新潟)
- 5) 黒岩有一, 石井雄二, 梅村隆志, 神吉けい太, 西川秋佳, 中澤裕之, 広瀬雅雄: 茶抽出物と亜硝酸ナトリウムの併用投与によるMNNG誘発ラット前胃発がん促進作用と酸化ストレスの関与, 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 7月, 2006

##### G-2. 発表論文

- 1) Ishii Y, Umemura T, Kanki K, Kuroiwa Y, Nishikawa A, Ito R, Saito K, Nakazawa H, Hirose M. A possible involvement of NO-mediated oxidative stress in induction of rat

- forestomach damage and cell proliferation by combined treatment with catechol and sodium nitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 447 (2): 127-135, 2006.
- 2) Ishii Y, Iijima M, Umemura T, Nishikawa A, Iwasaki Y, Ito R, Saito K, Hirose M, Nakazawa H. Determination of nitrotyrosine and tyrosine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry in livers of mice administered acetaminophen. *J Pharm Biomed Anal.*, 41: 1325-1331, 2006.
- 3) Ishii Y, Ogara A., Okamura T., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M., Nakazawa H.: Development of quantitative analysis of 8-nitroguanine concomitant with 8-hydroxydeoxyguanosine formation by liquid chromatography with mass spectrometry and glyoxal derivatization, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43: 1737-1747, 2007.
- 4) Ishii Y, Ogara A., Katsumata T., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M., Nakazawa H.: Quantification of nitrated tryptophan in proteins and tissues by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44: 150-159, 2007.
- 5) Kuroiwa Y, Ishii Y, Umemura T, Kanki K, Mitsumori, K, Nishikawa A, Nakazawa H, Hirose M. Combined treatment with green tea catechins and sodium nitrite selectively promotes rat forestomach carcinogenesis after initiation with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Cancer Sci.*, 98:949-957, 2007.
- 6) Okazaki K, Ishii Y, Kitamura Y, Maruyama S, Umemura T, Miyauchi M, Yamagishi M, Imazawa T, Nishikawa A, Yoshimura Y, Nakazawa H, Hirose M. Dose dependent promotion of forestomach carcinogenesis by combined treatment with sodium nitrite and ascorbic acid after initiation with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine - Possible contribution of nitric oxide-associated oxidative DNA damage. *Cancer Sci.* 97: 175-182, 2006.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし
- 【参考文献】
- 1) Okazaki K., Ishii Y., Kitamura Y., Maruyama S., Umemura T., Miyauchi M., Yamagishi M., Imazawa T., Nishikawa A., Yoshimura Y., Nakazawa H., Hirose M.: Dose-dependent promotion of rat forestomach carcinogenesis by combined treatment with sodium nitrite and ascorbic acid after initiation with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine: Possible contribution of nitric oxide-associated oxidative DNA damage, *Cancer Sci.*, 97 (3),

- 175-182 (2006)
- 2) Ishii Y., Umemura T., Kanki K., Kuroiwa Y., Nisikawa A., Ito R., Saito K., Nakazawa H., Hirose M.: Possible involvement of NO-mediated oxidative stress in induction of rat forestomach damage and cell proliferation by combined treatment with catechol and sodium nitrite, *Arch. Biochem. Biophys.*, 447, 127-135 (2006)
  - 3) Alvarez B., Rubbo H., Kirk M., Barnes S., Freeman B. A., Radi R.: Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration, *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 390-396 (1996)
  - 4) Yamakura F., Matsumoto T., Fujimura T., Taka H., Murayama K., Imai T., Uchida K.: Modification of a single tryptophan residue in human Cu, Zn-superoxide dismutase by peroxynitrite in the presence of bicarbonate, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1548, 38-46 (2001)
  - 5) B. Alvarez, V. Demichelli, R. Duran, M. Trujillo, Cervenansky C., Freeman B.A., Radi R.: Inactivation of human Cu, Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical, *Free. Radic. Biol. Med.*, 37, 813-822 (2004)
  - 6) Nakae D., Mizumoto Y., Kobayashi E., Noguchi O., Konishi Y., Improved genomic/nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of small amount of rat liver tissue, *Cancer Lett.*, 97, 233-239 (1995)
  - 7) Kasai H.: Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Radical. Biol. Med.*, 33, 450-456 (2002)
  - 8) Helbock H.J., Beckman K.B., Shinaga M.K., Walter P.B., Woodall A.A., Yeo H.C., Ames B.N.: DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 288-293 (1998)
  - 9) Hensley K., Maitt M.L., Yu Z., Snag H., Markesbery W.R., Floyd R.A.: Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation, *Neurosci J.*, 18, 8126-8132 (1998)
  - 10) Ishii Y., Iijima M., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M., Nakazawa H.: Determination of nitrotyrosine and tyrosine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and immunohistochemical analysis in liver of mice administered acetaminophen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 1325-1331 (2006)
  - 11) Knight T. R., Ho Y. S., Farhood A., Jaeschke H.: Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: protection by glutathione, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 3, 468-475 (2002)
  - 12) Hinson J. A., Michael S. L., Ault S. G., Pumford N. R.: Western blot analysis for nitrotyrosine protein adducts in livers of saline-treated and acetaminophen-treated mice, *Toxicol. Sci.*, 53, 467-473 (2000)
  - 13) James L.P., McCullough S.S., Lamps L.W.,

Hinson J.A.: Effect of N-acetylcysteine on acetaminophen toxicity in mice: relationship to reactive nitrogen and cytokine formation, *Toxicol. Sci.*, 2, 458-467 (2003)

- 14) Hensley K., Madit M. L., Pye Q. N., Stewart C. A., Wack M., Tabatabaie T., Floyd R. A.: Quantitation of protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by high-performance liquid chromatography with electrochemical array detection, *Anal. Biochem.*, 251, 187-195 (1997)

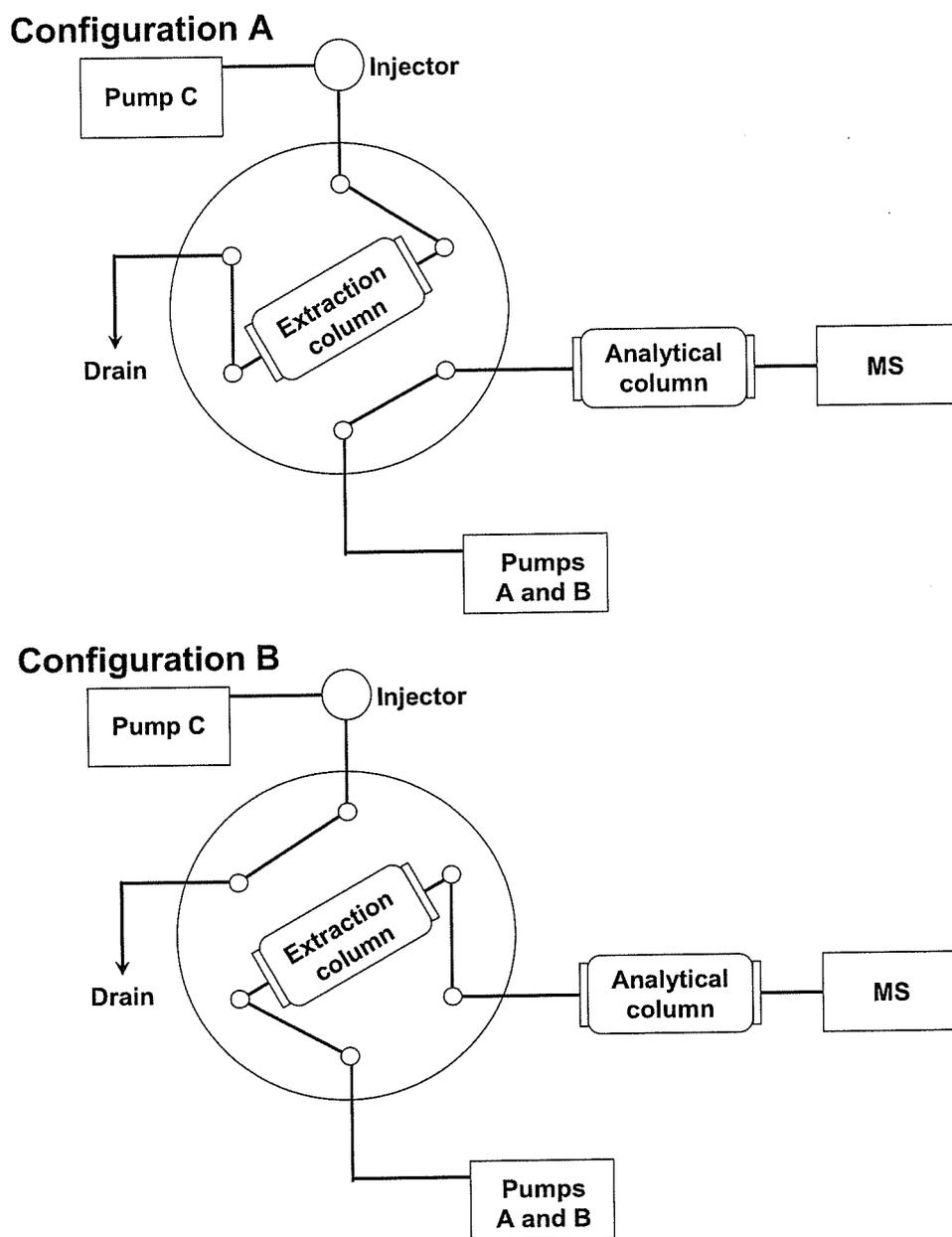


Fig. 1 Schematic of the CS-LC-ESI/MS system.

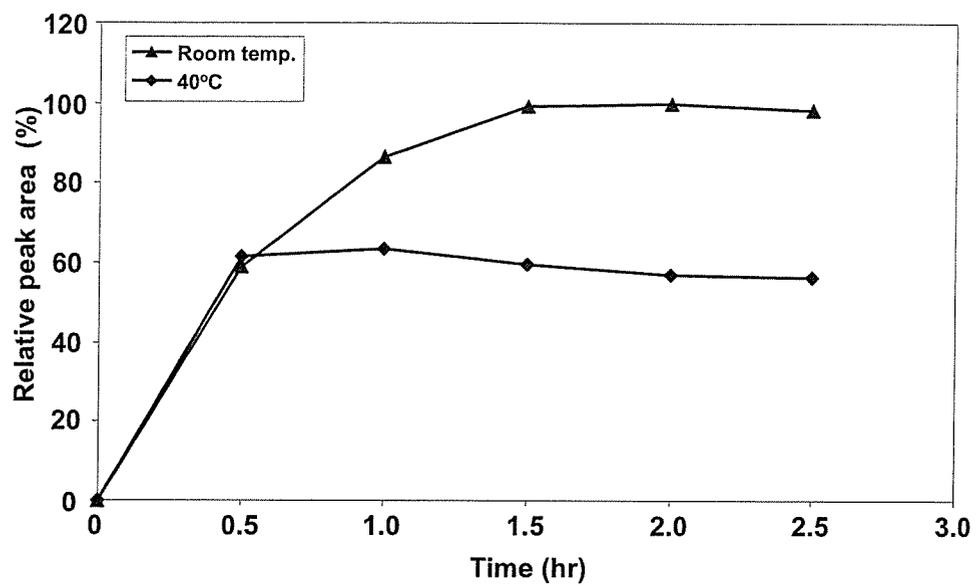


Fig. 2 Effect of reaction temperature and time on the peak area of NO<sub>2</sub>Gua. NO<sub>2</sub>Gua (100 nM) was incubated with 0.5% MTNG dissolved in DMSO at room temperature or 40°C.

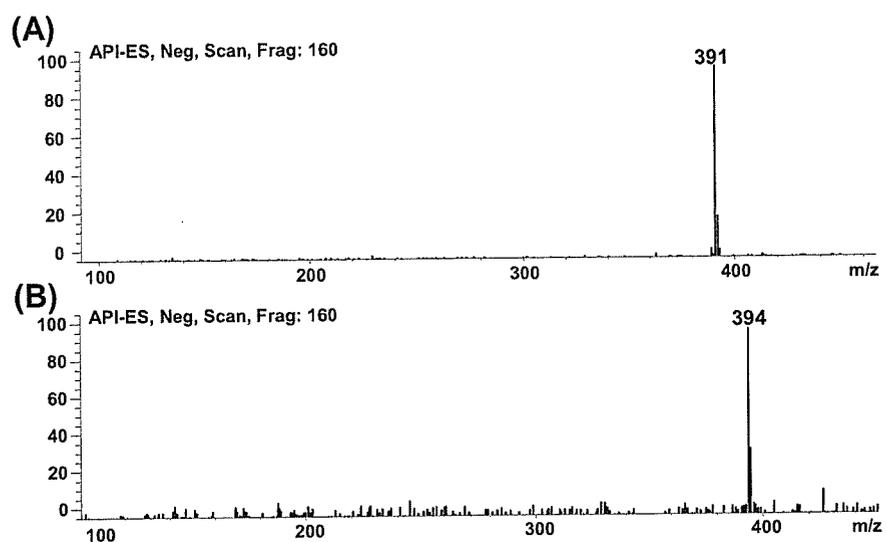


Fig. 3 Mass spectra of NO<sub>2</sub>Gua-MTNG (a) and [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-NO<sub>2</sub>Gua-MTNG (b).

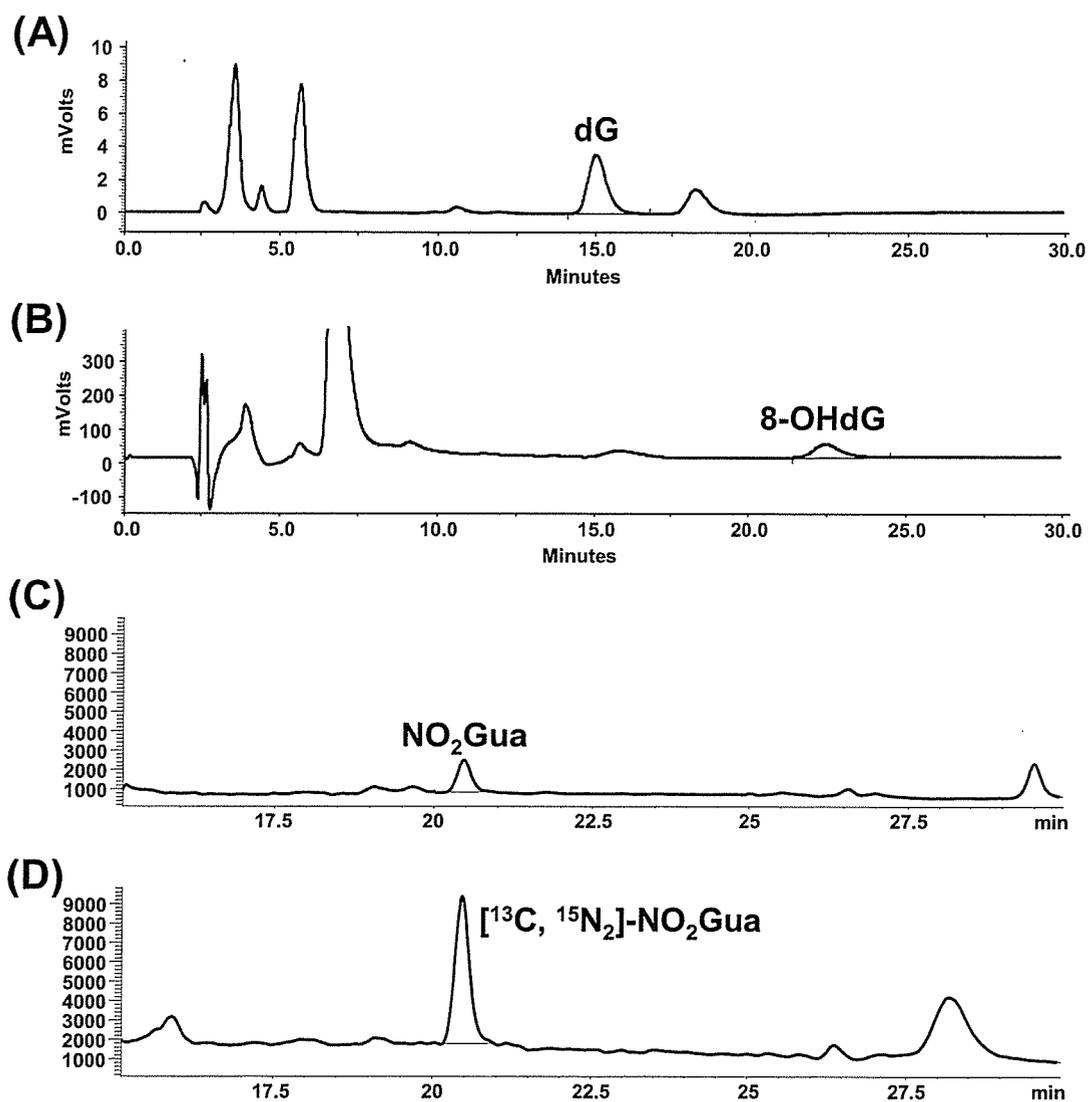


Fig. 4 LC-UV-ECD and CS-LC-ESI/MS chromatograms of calf thymus DNA treated with ONOO<sup>-</sup>. (a) UV (290 nm) chromatogram of dG. (b) ECD (300 mV) chromatogram of 8-OHdG. (c) CS-LC-ESI/MS (SIM 391) chromatogram of NO<sub>2</sub>Gua. (d) CS-LC-ESI/MS (SIM 394) chromatogram of [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-NO<sub>2</sub>Gua as a surrogate standard. Calf thymus DNA (250 μg/ml) dissolved in 1.0 mM DTPA containing sodium phosphate buffer (pH 7.4) was incubated with ONOO<sup>-</sup> at several concentrations for 60 min at 37°C.

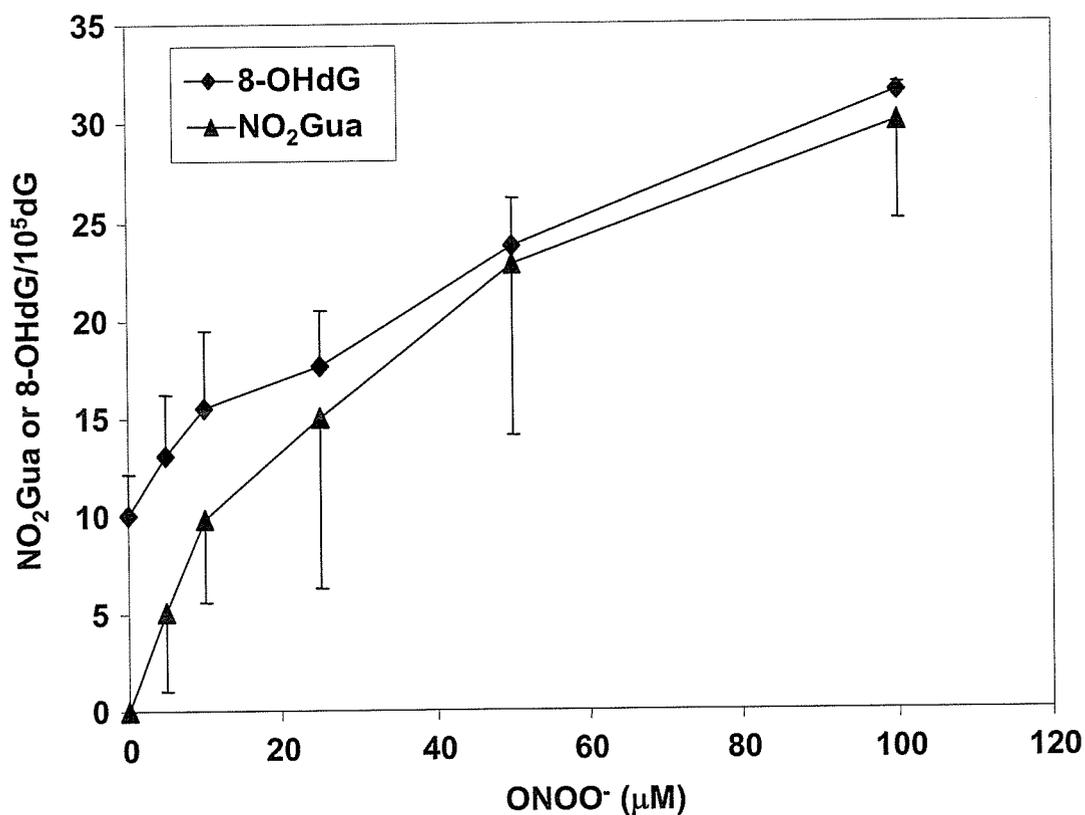


Fig. 5 NO<sub>2</sub>Gua and 8-OHdG formation in calf thymus DNA treated with ONOO<sup>-</sup>. Calf thymus DNA (250 μg/ml) dissolved in 1.0 mM DTPA containing sodium phosphate buffer (pH 7.4) was incubated with ONOO<sup>-</sup> at several concentrations for 60 min at 37°C. After DNA digestion, 50 μl portion of the sample was subjected to HPLC-UV-ECD for 8-OHdG and dG analysis. One hundred microliter portion of the sample was subjected to CS-LC-ESI/MS after MTNG derivatization for NO<sub>2</sub>Gua analysis. The amount of NO<sub>2</sub>Gua and 8-OHdG was calculated as NO<sub>2</sub>Gua/10<sup>5</sup>dG and 8-OHdG/10<sup>5</sup>dG, respectively. Values are means ± S.D. of three separate experiments.

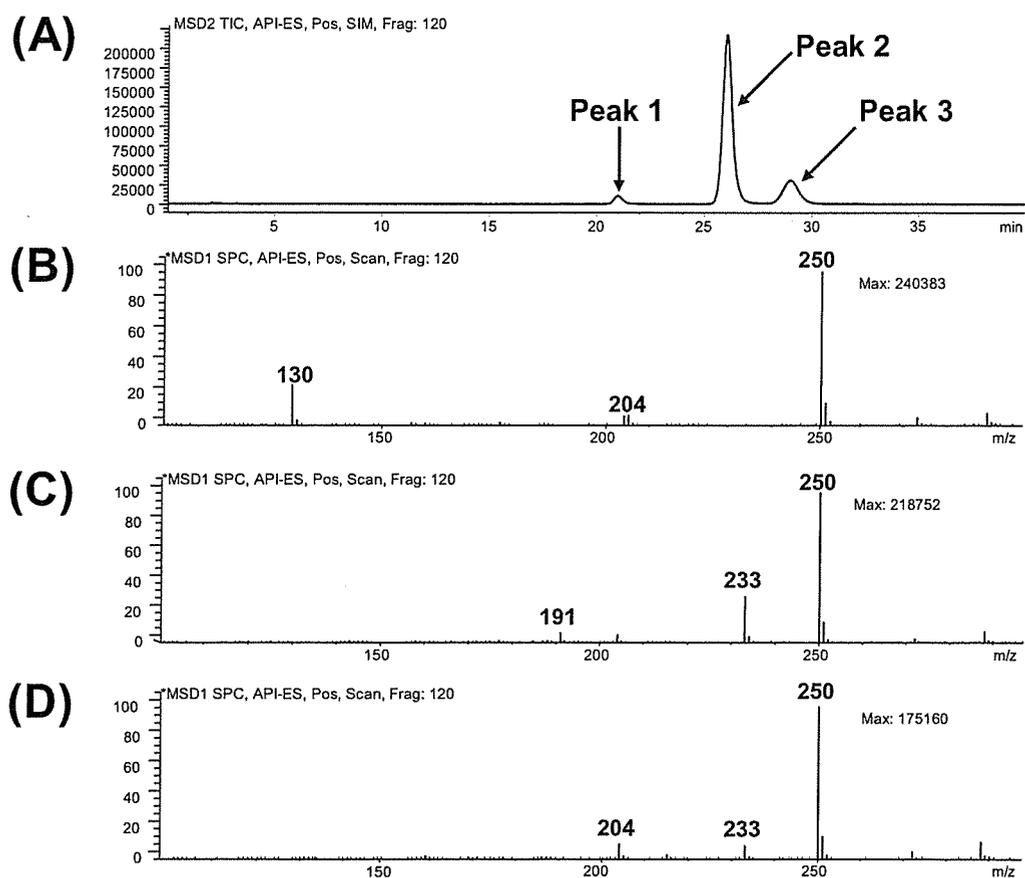


Fig. 6 SIM chromatogram and mass spectra of the products of  $\text{NO}_2\text{Trp}$  synthesis. (A) SIM chromatogram ( $m/z$  250) of reaction mixture. Mass spectra of the each peaks, which were eluted from the C18 column at 21.1 min (B), 26.2 min (C) and 29.0 min (D).

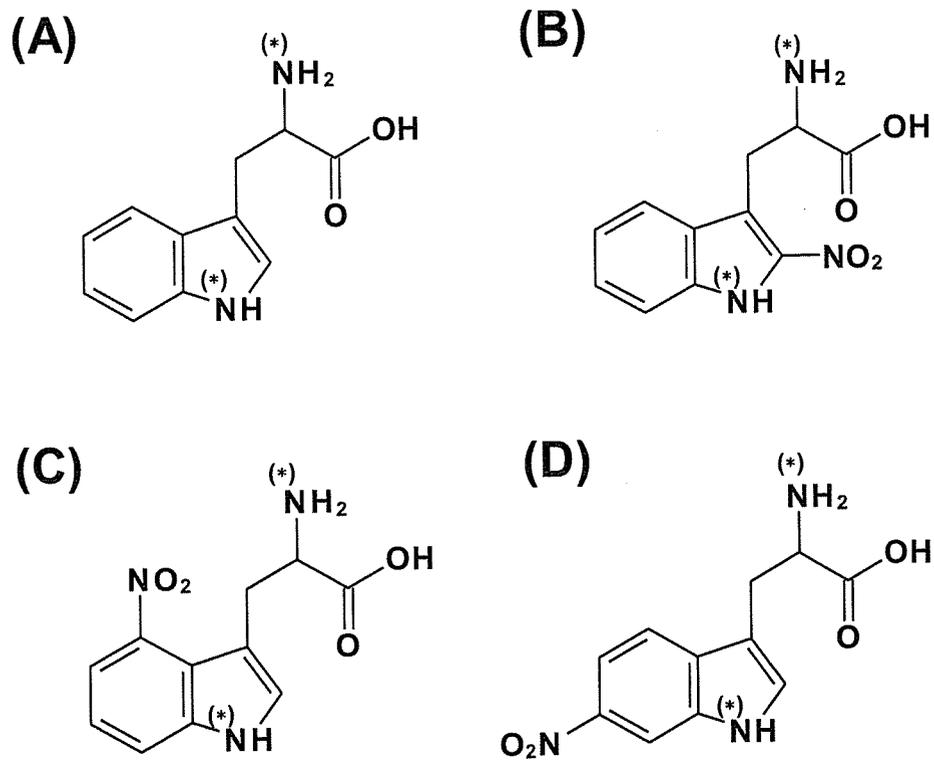


Fig. 7 Chemical structures of Trp, NO<sub>2</sub>Trp isomers and each stable isotopically labeled compound. (A) Trp, (B) 2-NO<sub>2</sub>Trp, (C) 4-NO<sub>2</sub>Trp (D) 6-NO<sub>2</sub>Trp. Asterisk (\*) indicates nitrogen 15-labeled.

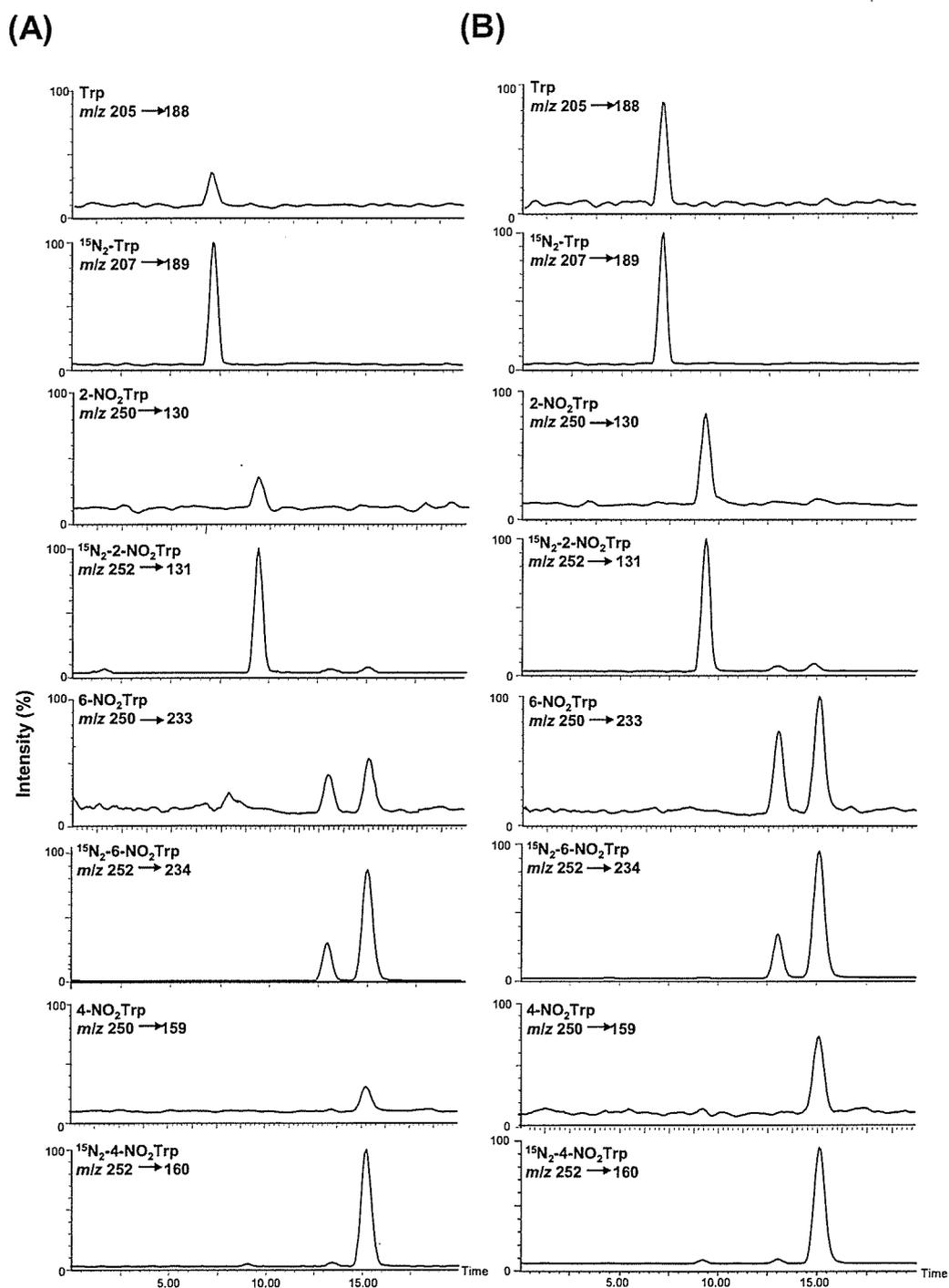


Fig. 8 MRM chromatograms of standards of Trp, NO<sub>2</sub>Trp and each surrogate standards at the LOD (A) and LOQ (B) levels.

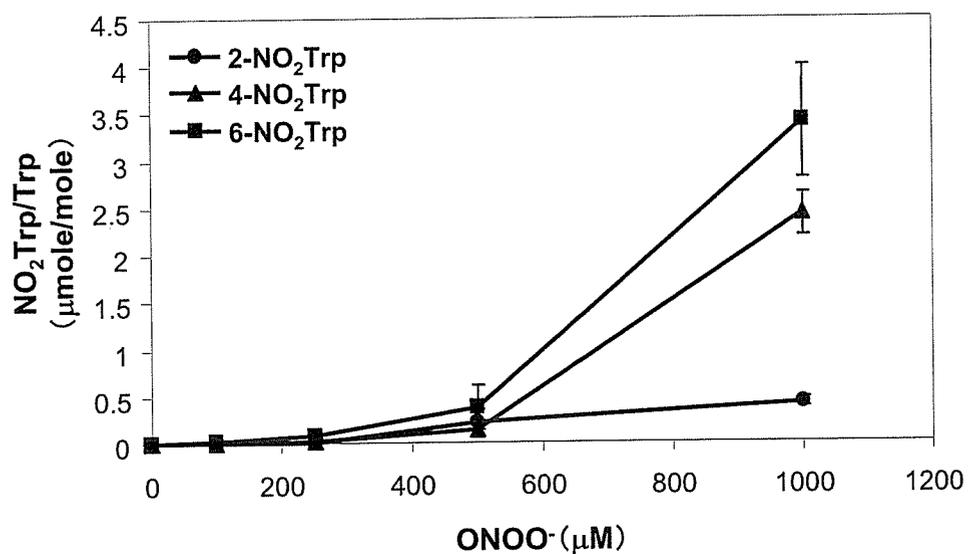


Fig. 9 Changes in NO<sub>2</sub>Trp levels in BSA reacted with several concentrations ONOO<sup>-</sup>. 10 mg/ml BSA dissolved in 1.0 mM DTPA containing sodium phosphate buffer (pH 7.4) was incubated with several concentrations ONOO<sup>-</sup> (0 – 1000 mM) for 60 min at 37°C. The amount of generation of each isomer was calculated by obtaining the ratio with Trp. Values are means ± S.D. of data for 5 samples.

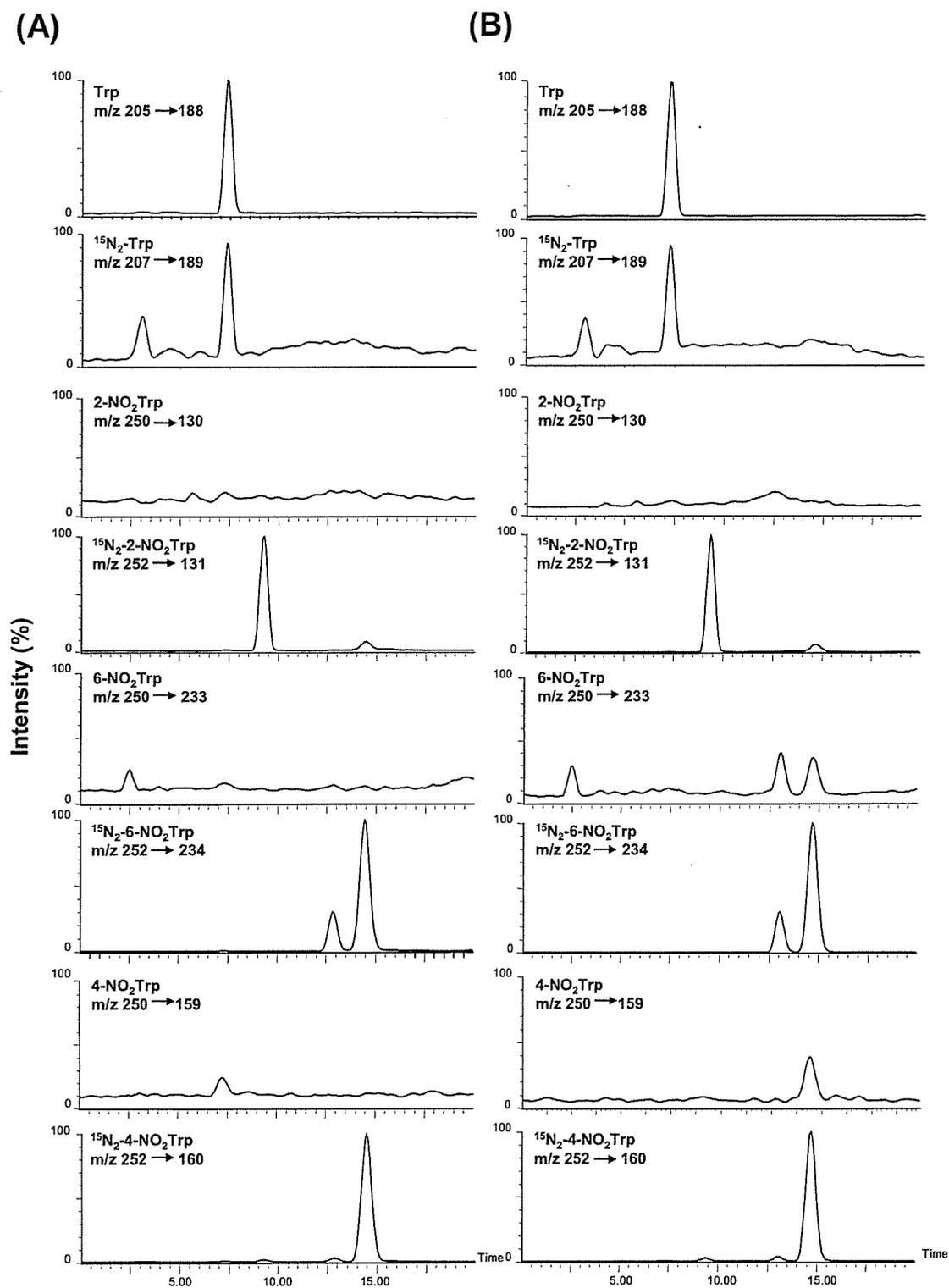


Fig. 10 MRM chromatograms of the mouse livers protein sample containing surrogate standards. (A) Liver from a saline treated mouse. (B) Liver from mouse administrated 300 mg/kg APAP for 8 hr after treatment.

**Table 1 Time program for CS-LC-ESI/MS**

<b>Time (min)</b>	<b>Procedure</b>	<b>Column position</b>	<b>Mobile Phase Ammonium acetate in water : Acetonitrile (v/v)</b>
0.00	Sample injection	Configuration A	80 : 20
5.00	Column switching	Configuration B	80 : 20
15.00	Start analysis		
25.00			65 : 35
25.01			30 : 70
30.00	Stop analysis		
40.00.		Configuration A	30 : 70
40.01			80 : 20
50.00	Next analysis		80 : 20

**Table 2 Monitoring ion of Trp and NO<sub>2</sub>Trp isomers for LC-MS/MS analysis**

	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Trp	205	188	20	11
<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Trp	207	189	20	11
4-NO <sub>2</sub> Trp	250	130	18	10
<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -4-NO <sub>2</sub> Trp	252	132	18	10
6-NO <sub>2</sub> Trp	250	233	20	11
<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -6-NO <sub>2</sub> Trp	252	234	20	11
7-NO <sub>2</sub> Trp	250	159	23	19
<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -7-NO <sub>2</sub> Trp	252	161	23	19

**Table 3 Recoveries of Trp and NO<sub>2</sub>Trp in digested mice liver samples (n=5)**

	<b>Added (nM)</b>	<b>Conc.</b>	<b>Recovery (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
<b>Trp</b>	<b>250</b>	<b>333.6 ± 4.1</b>	<b>99.3</b>	<b>1.65</b>
	<b>500</b>	<b>603.9 ± 17.9</b>	<b>103.7</b>	<b>3.46</b>
	<b>0</b>	<b>85.4 ± 0.2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>2-NO<sub>2</sub>Trp</b>	<b>25</b>	<b>24.7 ± 0.5</b>	<b>98.8</b>	<b>2.05</b>
	<b>100</b>	<b>97.1 ± 4.6</b>	<b>97.1</b>	<b>4.76</b>
	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>4-NO<sub>2</sub>Trp</b>	<b>50</b>	<b>49.0 ± 4.7</b>	<b>97.9</b>	<b>9.57</b>
	<b>200</b>	<b>192.3 ± 7.0</b>	<b>96.1</b>	<b>3.63</b>
	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>6-NO<sub>2</sub>Trp</b>	<b>25</b>	<b>24.9 ± 1.9</b>	<b>99.5</b>	<b>7.44</b>
	<b>100</b>	<b>98.4 ± 1.8</b>	<b>98.4</b>	<b>1.81</b>
	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>