

Time-of-Flight LC/MS を用いた オオミジンコ飼育水中からのカイロモン同定

アプリケーション

天然物化学

著者

内田 秀明
アジレント・テクノロジー(株)
東京都八王子市高倉町 9-1

Jerry A. Zweigenbaum
Agilent Technologies Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

楠見 武徳
徳島大学 薬学部 名誉教授

大井 高
徳島大学 薬学部 准教授

要旨

ミジンコのカイロモンは緑藻に形態変化を生じさせます。冷凍ミジンコ (*Daphnia pulex*) から単離・構造決定された活性化合物の1つ (8-methylnonyl sulfate) がオオミジンコ (*Daphnia magna*) 飼育水から直接同定されました。メチレンブルー法で濃縮後に、エレクトロスプレーイオン源を付けた Time-of-Flight LC/MS を用いて実験は行なわれました。

緒言

フェロモンは同種生物の異個体間で様々な行動を引き起こす化学物質です。一方、『カイロモン』は食物連鎖中で他の動植物に影響を与える化学物質です。単細胞緑藻をミジンコ共存下で培養すると、2, 4, 8 個が結合した形に変化する現象は数多く報告されてきました。しかしながら、培養液中の活性化合物濃度が非常に低いために、それらの化合物の単離・解明は長い間行なわれませんでした。これまでにないアプローチによってついにその活性化合物類は単離され、化学構造が解明されました。その実験は、市販の冷凍ミジンコ (*Daphnia pulex*) 10 kg から、精製・化学合成・バイオアッセイを駆使して行なわれました。化学合成された脂肪族硫酸エステル類は、ppb (10^{-6} g/L) レベルの至適値を持つ低濃度で植物プランクトンに形態変化を間違いなく生じさせることが確認されました。これらのミジンコカイロモンは陰イオン界面活性剤なので、メチレンブルー法[1]で定量的に検出されます。ミジンコ飼育水中の陰イオン界面活性剤合計濃度は 8.0 ppb と定量されました。しかし、メチレンブルー法では陰イオン界面活性剤の総量を定量することは可能でも、個々の化合物を化学的に同定することは不可能でした。

活性化化合物群は冷凍ミジンコ (*D. pulex*) から単離されましたが、オオミジンコ (*D. magna*) がバイオアッセイに用いられました。冷凍ミジンコ (*D. pulex*) は市販されており容易に入手できますが、一方で、オオミジンコ (*D. magna*) は大型でバイオアッセイに適している反面、kg スケールの大量飼育は困難です。個々の種は異なる化合物群を放出している可能性があります。したがってこのアプリケーションでは、オオミジンコ (*D. magna*) 飼育水から直接カイロモンを同定することを試み、確認できたことを報告します[2]。

これらの脂肪族硫酸エステル類を汎用されている HPLC 検出器（紫外可視検出器や蛍光検出器）で検出することは困難です。LC/MS では、負イオンモードでのエレクトロスプレーイオン化法（ESI）がこれらの化合物には最適です。その理由は、全ての目的の硫酸エステル群（R-OSO₃⁻M⁺）や硫酸アミド群（R-NHSO₃⁻M⁺）は水溶液中で簡単にイオン化し、それぞれ R-OSO₃⁻ や R-NHSO₃⁻ に解離するからです。Time-of-Flight LC/MS は精密質量が測定できることによって、四重極型に比べて化合物の同定能力に優れています。

前述の理由によって、この実験では ESI を付けた Time-of-Flight LC/MS を選択し、オオミジンコ (*D. magna*) 飼育水から直接活性化化合物を直接検出して同定しました。さらに、今回用いた LC/MS の直行型スプレーは多くの夾雑物が含まれている場合でさえイオン化阻害を受けにくくなっています。

実験

化合物 1, 6, 7 はそれぞれ、シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社（東京）、関東化学株式会社（東京）、東京化成工業株式会社（東京）から購入しました。化合物 2, 3, 5 は化学合成されました。化合物 4 はミジンコ抽出物から単離されました。

用いた装置では、2 本目のネブライザーとキャリブレーション送液システム (m/z 112.9856 と 1033.9881 を含むマス軸校正用内部標準液を低流速で導入する) を使って、内部マス軸校正が常に自動的に行なわれました。装置のソフトウェアはこれらの既知物を基準として測定された全スペクトルのマス軸を常時校正します。

5L のオオミジンコ (*D. magna*) 飼育水（1L あたり 250 個体を含む脱塩素水道水で 1 週間）をメチレンブルー法で 100mL に濃縮しました。引き続いてそのメチレンブルー試薬を陽イオン交換樹脂（DOWEX 50WX8-100）で除去しました。その濃縮試料を乾固し、Milli-Q

水 25mL に再溶解して LC/MS 分析試料としました。これらの処理後、元の飼育水から換算して 200 倍に濃縮されました。表 1 に示した標準試料（各 100ppb、化合物 4 はミジンコ抽出物から単離され標準試料が入手できなかったため濃度は任意）と濃縮した飼育水を、ESI を付けた Time-of-Flight LC/MS の同一条件で分析しました。

LC/MS 詳細条件

LC 条件

装置:	Agilent LC 1100
カラム:	ZORBAX Eclipse XDB-C18 50 mm x 2.1 mm 3.5 μm (p/n 971700-902)
カラム温度:	40 °C
移動相:	A: 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B: アセトニトリル
グラジエントと流速:	0 min. で B 30% (0.3 mL/min.) 3 min. で B 30% (0.3 mL/min.) 8 min. で B 95% (0.3 mL/min.) 8.1 min. で B 95% (0.5 mL/min.) 12 min. で B 95% (0.5 mL/min.) 12.1 min. で B 30% (0.5 mL/min.) 17 min. で B 30% (0.5 mL/min.)
注入量:	10 μL

MS 条件

装置:	Agilent 6210 Time-of-Flight LC/MS
イオン源:	エレクトロスプレー 負イオンモード
乾燥ガス流速:	10 L/min. (N ₂)
ネブライザー:	350 kPa. (N ₂)
乾燥ガス温度:	350 °C
V _{cap} :	5000 V
フラグメンター電圧:	250 V
スキャンモード:	m/z 50-1100, 10,000 transients/scan, 0.89 scan/sec.
リファレンスマス:	m/z 112.9856 と 1033.9881

結果と考察

6 つの硫酸エステル（化合物 1, 2, 3, 5, 6, 7）と 1 つの硫酸アミド（化合物 4）は LC/MS 用揮発性移動相（酢酸アンモニウムとアセトニトリル）で分離されました。ここで、化合物 2 と 3、化合物 5 と 6、はそれぞれ 1 組の異性体ですが、クロマトグラム上で分離されています。実質的な分析時間は、粒子径の比較的小さい（3.5 μm）短いカラム（50 mm）を用いて、10 分以下に短縮されました。2 種類のリファレンス化合物を用いた自動的に連続的なマス軸校正によって、非常に正確な精密質量測定が行なわれました。これによって、合成化合物だけでなくミジンコ飼育水中未知化合物から推定される候補組成式の数は少なくなりました。

脱プロトン化分子だけでなく、 m/z 97 のフラグメント（HOSO₃⁻）を生じさせるために、衝突誘起解離（CID: in-source collision induced dissociation）を使用しました。MS フラグメンター電圧を 250 V に設定するこ

とによって、全ての硫酸エステル群のマススペクトル中に各脱プロトン化分子と共に共通フラグメント (m/z 97) が観測されました。図 1 に示したように、 m/z 97 のマス chromatogram は目的化合物の選択的な指標となります。各標準物質の脱プロトン化分子の測定誤差は、表 1 に示したように 0.4 mDa 以下でした。

オオミジンコ (*D. magna*) 飼育水をメチレンブルー法で濃縮し、引き続いて陽イオン交換樹脂でメチレンブルー試薬を除去しました。この方法を応用して、有機層中でアニオンとメチレンブルーとの錯体を 200 倍に濃縮しました。この濃縮した飼育水を同条件下で Time-of-Flight LC/MS 分析しました。

表 1. 標準物質の測定結果

No.	[M-H] ⁻	m/z 計算値	m/z 測定値
1	C ₈ H ₁₇ O ₄ S	209.0853	209.0857
2	C ₉ H ₁₉ O ₄ S	223.1009	223.1011
3	C ₉ H ₁₉ O ₄ S	223.1009	223.1013
4	C ₁₁ H ₂₄ NO ₃ S	250.1482	250.1484
5	C ₁₀ H ₂₁ O ₄ S	237.1166	237.1167
6	C ₁₀ H ₂₁ O ₄ S	237.1166	237.1164
7	C ₁₂ H ₂₅ O ₄ S	265.1479	265.1481

m/z 97 フラグメントのマス chromatogram は目的硫酸エステルに対する高選択性の指標であり、飼育水中のように夾雑物中で硫酸エステルを含む化合物を同定するのに特に有効です (図 2)。図 2 中 m/z 97 と 237 の保持時間は、図 1 中の標準品 5 に一致します。このことは飼育水が化合物 5 を含むことを強く示唆しています。

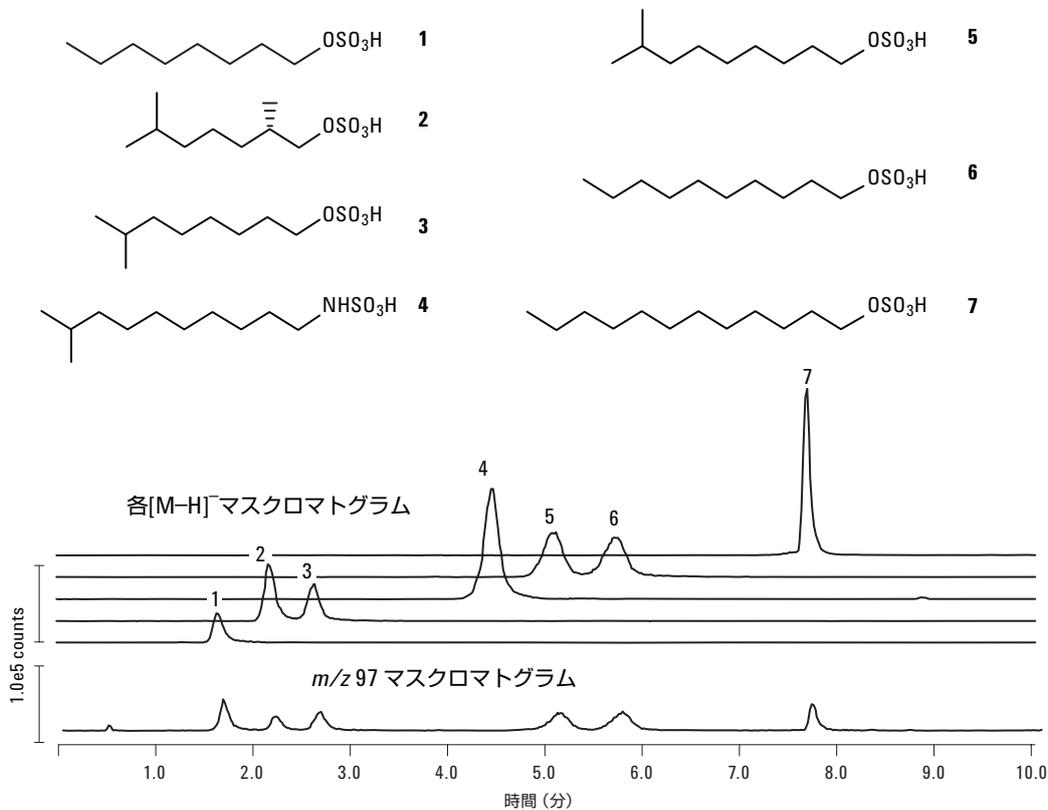


図 1. 化学構造と、標準品の [M-H]⁻ と硫酸エステル共通フラグメントのマス chromatogram

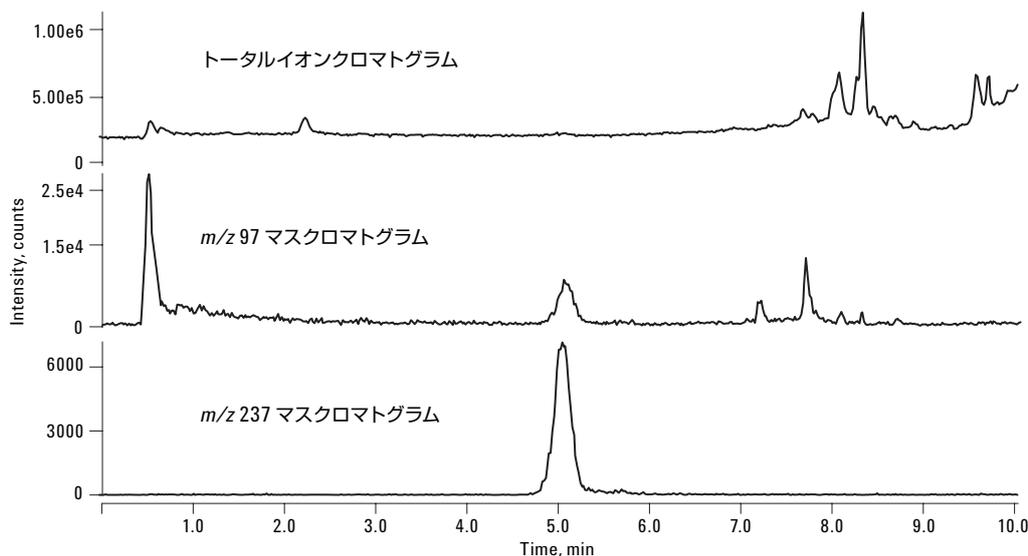


図2. オオミジンコ飼育水のトータルイオンクロマトグラムとマスプロット

以下に述べるマススペクトルデータから、オオミジンコ (*D. magna*) 飼育水中から化合物5を同定し確認しました。脱プロトン化分子（負イオンモードでの[M-H]⁻）の精密質量は、その化合物の分子量と組成式を与えてくれます。未知化合物の可能性のある組成式を求めようとする場合に、誤差が少ないことは非常に重要です。実際、C₀₋₂₀, H₀₋₄₅, N₀₋₅, O₀₋₅, S₀₋₅の条件で許容誤差10 ppmとすると、*m/z* 237.1169 (図3)は、僅か3つの候補しか出てきません：C₁₀H₂₁O₄S (誤差0.3 mDa), C₁₁H₁₇N₄S (誤差-1.0 mDa), C₁₄H₁₃S (誤差2.3 mDa)。

フラグメントイオンの精密質量測定からも、その分子が含む部分構造の元素種類と数が得られ、これは重要な構造情報です。許容誤差10 ppmとし上記と同じ元素条件では、*m/z* 96.9602は僅か1つの組成式：HO₄S (誤差

0.1 mDa)しか与えません。許容誤差20 ppmとし同条件では、3つの候補組成式：HO₄S、C₄HOS (誤差-15 mDa)、HO₂S₂ (誤差18 mDa)です。

検出され確認された8-methylnonyl sulfate (5)は、汎用されている界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム (SDS、7のナトリウム塩)に類似しています。ここで述べられた他の全ての活性なカイロモンも、分子内の極性部分と非極性部分とによって界面活性剤として挙動します。膨大な量の界面活性剤が洗剤として生産されてきており、その一部は環境に放出されています。したがって、環境中に放出された物質がカイロモン様の作用をして、間接的に湖沼での食物連鎖を混乱させたり、生態系中で環境ホルモ的な作用を起こすことが懸念されます。

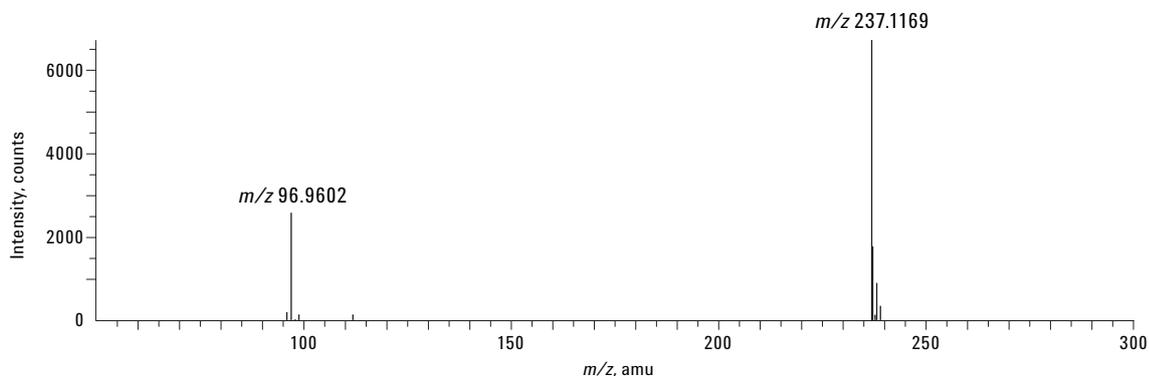


図3. オオミジンコ飼育水5.1分ピーク (図2) のマススペクトル

結論

ミジンコカイロモンが、簡単なメチレンブルー法前処理とESIを付けたTime-of-Flight LC/MSの組み合わせで同定されました。この同定は化学合成された標準物質と活性化合物の保持時間とマススペクトルを比較して行なわれました。実サンプルの結果と m/z 理論値との差は0.3 mDaでした。用いた方法は誘導体化も必要なく、ESIの負イオンモードを採用したため低バックグラウンドでした。SO₄基を持つ目的化合物はMSパラメータ（フラグメンター電圧）を調整することで、選択的に検出されました。マス軸校正のための全自動化されたリファレンス化合物導入システムによって非常に安定した信頼性の高い精密質量結果が得られました。

他のカイロモン化合物類の存在は推定されていますが、飼育水からミジンコカイロモンを直接化学的に検出したのはこれが最初です。

参考文献

1. 青村和夫、芦立德厚、相沢貴子、藤田正彦、後藤克己、長谷部清、藁目清一郎、川村静夫、木村道也 他、水の分析（第3版）、日本分析化学会北海道支部編、化学同人、p.374-378、(1981)。
2. Hideaki Uchida, Ko Yasumoto, Akinori Nishigami, Jerry A. Zweigenbaum, Takenori Kusumi, and Takashi Ooi. "Time-of-Flight LC/MS Identification and Confirmation of a Kairomone in *Daphnia magna* Cultured Medium," *Bull. Chem. Soc. Jpn.* Vol. 81, No. 2, 298-300, (2008)

詳細情報

アジレントの製品、アプリケーションについての詳細情報は、ホームページをご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。また、本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
April 17, 2008
5989-8387.JAJP