

Positive / Negative Ion Mode を相補的 活用した Q-TOF LC/MS による パリトキシン関連化合物の構造研究



Authors

安元 健
(一財)日本食品分析センター
顧問
東北大学農学部名誉教授

阿部 尚樹
東京農業大学応用生物科学部
教授

内田 秀明
アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

本アプリケーションノートでは、Q-TOF LC/MS を用いて複雑な構造を有する海洋天然物の構造を解明する手法をご紹介します。

パリトキシンは渦鞭毛藻が生産する有毒な天然有機化合物で、これ自体は絶対構造まで決定されていますが、構造の複雑さから化学構造が完全に明らかにされている類縁体は限られています。構造既知のオストレオシン D を用いて、Q-TOF プロダクトイオンスペクトル測定を試みたところ多くのシグナルが帰属でき、Positive / Negative ion mode のそれぞれから異なる有用な構造情報が得られることが確認できました。

またその結果を基に、構造未知の類縁体に上記の構造情報を適用した結果、NMR 等だけでは決定できなかった構造を微量で推定することができました。

Key words: 海洋天然物、構造研究

はじめに

●パリトキシンと天然有機化合物の構造決定手法

パリトキシン (C₁₂₉H₂₂₃N₃O₅₄) は、渦鞭毛藻が生産する有毒な天然有機化合物です。ペプチド等とは異なり繰り返し構造は持たず、NMR、MS、有機合成によってその絶対構造まで決定されています。他の天然物同様類縁体が知られていますが、構造の複雑さから化学構造が完全に明らかにされている類縁体は限られています。わずかな構造の差異が毒性の強弱に関連し、地中海沿岸等では健康被害も報告されていることから、できるだけ微量で、簡単、迅速に構造を解明することが求められています。

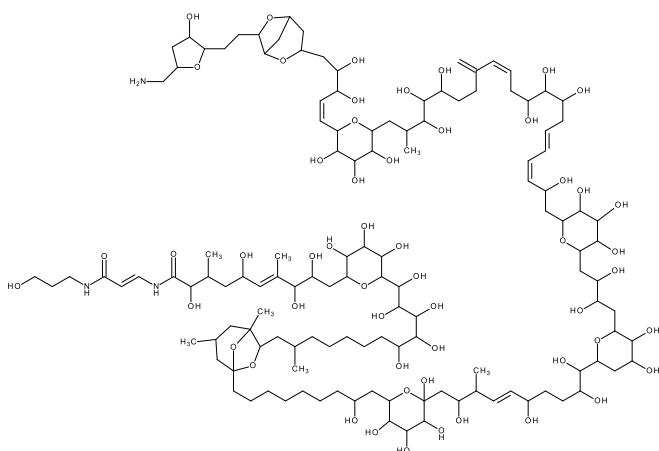


図1. パリトキシンの平面構造式

天然有機化合物の構造決定には、NMRとMSが不可欠です。NMRは原則として化合物を単離して測定します。非破壊型測定なので試料は100%回収可能ですが、¹³C-NMRでは一般にmgオーダーの試料量が必要で、天然物では収集して単離するのが困難な場合もあります。一方、LC/MSではHPLCで分離後にオンライン測定が可能なので夾雑物が含まれていても測定は可能で、更にQ-TOFの場合はクロマトグラム上で分離が困難な場合でもm/z値で選択してTOFに導入できます。MSは破壊型の分析で試料は回収できませんが、高感度化が進んでおり多くの化合物はngオーダー程度でスペクトル測定可能です。ただし感度はイオン源の選択や化合物のイオン化効率に強く依存します。

●イオン化と移動相について

参考文献1では、G6520 Q-TOFを用いました。参考文献2では、G6530 Q-TOFを用いAgilent Jet Streamパラメータ、移動相共に最適化することで高感度化に成功しました。具体的には移動相を0.1%ギ酸系から0.01%酢酸系に変更し、イオン化パラメータをあえて若干イオン化効率が落ちる方向に調整して、2価イオンの強度を減らし1価イオンの強度を増やしました。

今回の実験では、プリカーサーイオンとしてそれぞれ[M+H]⁺と[M-H]⁻とを選択しました。イタリアの研究グループは2価イオンや3価イオンをプリカーサーイオンに選んでいる報告例もありますが、2価領域ではMSスペクトルの重

なりが生じたり、[M-H₂O+2H]²⁺が生じたりします。後述しますが、今回の方法は詳細にプロダクトイオンスペクトルを解析して、脱水シグナルから水酸基の位置を推定することが大きな特長の1つなので、プリカーサーイオンの段階で脱水してしまうと解析に用いることができません。

分析条件

●システム構成一例

1290 Infinity Binary Pump (G4220A)
1290 Infinity Wellplate Sampler (G4226A)
1290 Thermostated Column Compartment (G1316C)
1290 Infinity Diode Array Detector (G4212A)
1260 Infinity Quaternary Pump (G1311C)
Q-TOF LC/MS (G6520A or G6530A)

表1. 最適化後の分析条件

LC	
移動相	A: 0.01% 酢酸水溶液 B: アセトニトリル
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18, 100 × 2.1 mm, 1.8 μm
流速	0.4 mL/min.(0 - 10 min.) 0.6 mL/min.(10.1 - 16 min.)
カラム温度	40 °C
注入量	1 - 20 μL (試料濃度による)
サンプル溶媒	50% MeOH水溶液
グラジエント	20 % B (0 - 2 min.) 20 - 40 % B (2 - 9 min.) 40 - 100 % B (9 - 10 min.) 100 % B (10 - 13 min.) 20 % B (13.1 - 16 min.)
分析時間	16 min.
MS	
イオン源	Agilent Jet Stream (AJS-ESI)
測定モード	MS and Targeted MS/MS
ドライガス設定	300 °C, 12 L/min.
シースガス設定	250 °C, 11 L/min.
ネブライザ圧力	20 psi
フラグメンタ電圧	400 V
ノズル電圧	1500 V
MS/MS条件	Isolation width: 4 Da. MS acq. rate: 3 spectra/sec. MS/MS acq. rate: 1 spectrum/sec. Collision energy: 150 eV (Pos.) Collision energy: 60 & 80 eV (Neg.)

表2. パリトキシンを含む類縁体の分子式と精密質量測定結果、置換基位置と種類

化合物	分子式	[M-H] ⁻ のm/z			[M+H] ⁺ のm/z			C ₃	C ₁₇	C ₁₉	C ₂₆	C ₄₂	C ₄₄	C ₆₄	C ₇₀	C ₈₂
		計算値	測定値	質量確度 (ppm)	計算値	測定値	質量確度 (ppm)									
Palytoxin	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₄							Me	OH	OH	Me	H	OH	OH	OH	H
OSTD	C ₁₂₇ H ₂₁₉ N ₃ O ₅₃	2633.4461	2633.4421	1.5	2635.4607	2635.4567	1.5	H	OH	H	H	OH	H	OH	OH	H
OSTB	C ₁₂₇ H ₂₁₉ N ₃ O ₅₄	2649.4410	2649.4344	2.5	2651.4556	2651.4536	0.7	H	OH	H	H	OH	OH	OH	OH	H
OVTa (地中海株)	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₂							Me	H	OH	Me	OH	H	H	OH	H
OVTa-IK2 (沖縄株)	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₂	2645.4825	2645.4748	2.9	2647.4970	2647.4878	3.5	Me	H	OH	Me	OH	H	OH	H	H
OVTd-IK2*	*同一RT C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₃	2661.4774	2661.4681	3.5	2663.4920	2663.4833	3.3	Me	H	OH	Me	OH	OH	OH	H	H
OVTe-IK2*	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₃							Me	H	OH	Me	OH	H	OH	H	OH

結果

●構造既知のモデル化合物オストレオシンDでの確認

まず、既にNMRと誘導体化後にFAB-MS測定によって完全に構造決定されているパリトキシン類縁体であるオストレオシンD (OSTD, C₁₂₇H₂₁₉N₃O₅₃) を用いて、Q-TOFプロダクトイオンスペクトルを構造に帰属できるかを確認しました。汎用リファレンス溶液では質量範囲が足りないため、今回の実験にはチューニング溶液を適宜濃度調整して、測定中のMS軸キャリブレーションに用いました。その結果、[M+H]⁺と[M-H]⁻共に2 ppm以下の良好な質量確度で分子量測定できました。(表2) プロダクトイオンスペクトルでもほとんどが5 ppm以下の良好な値でした。負イオ

ンモードでのプロダクトイオンスペクトルを解析すると、図2に示す炭素骨格を確認できる位置で切れたフラグメントが帰属できました。各フラグメントの同位体比も理論値と比較しながら解析を行いました。一方、正イオンモードでのプロダクトイオンスペクトル (図3) では、負イオンモードとは異なる位置でのフラグメントが生じていました。更に、多くの水酸基が連続的に脱水して、結果として共役ポリエン構造を有するフラグメントが生成していると帰属できました。一例として、ポリエンKシリーズを図4に示します。化合物に元々存在する二重結合も含めて、水酸基結合位置によっては、共役ポリエン生成が途切れてしまうことに基づいています。

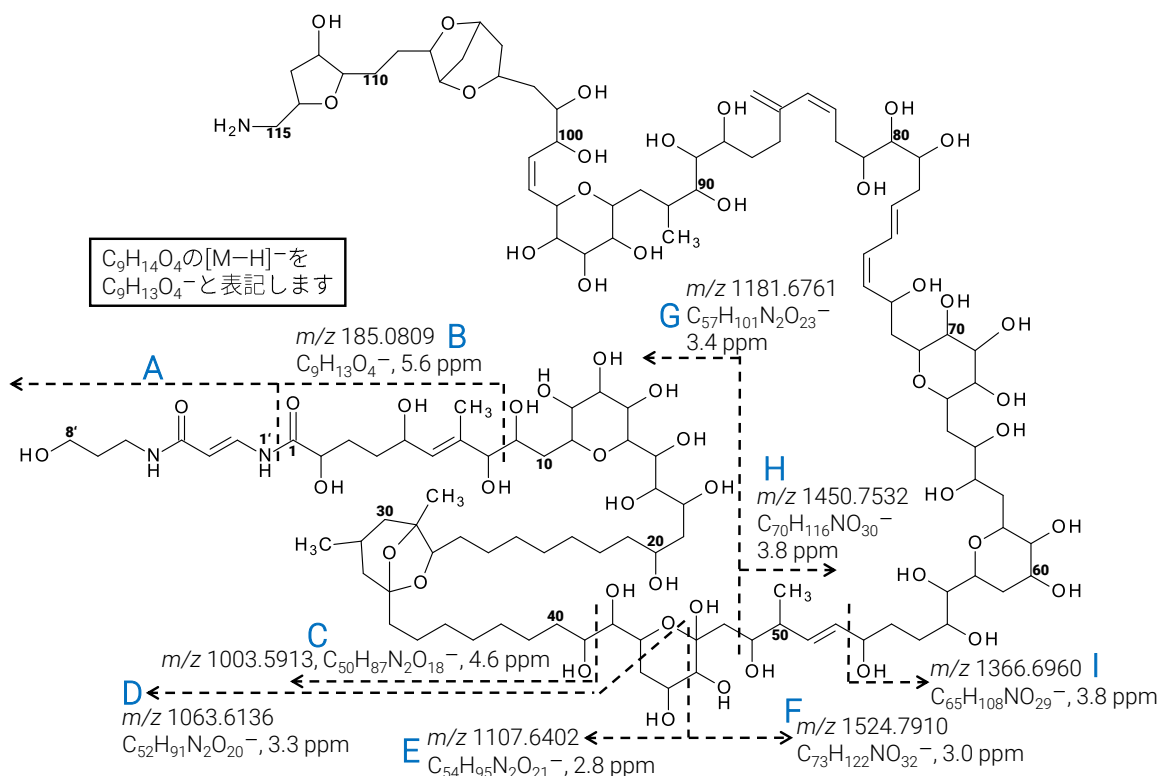


図2. オストレオシンD プロダクトイオンスペクトルフラグメント帰属 (負イオンモード)

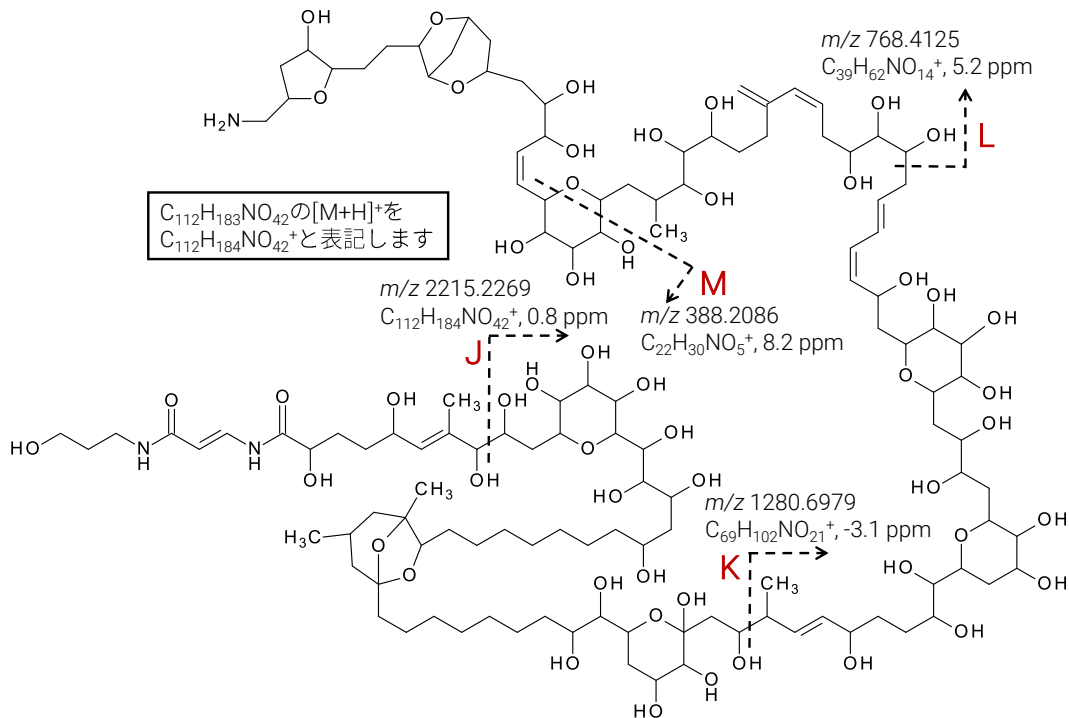


図3. オストレオシンD プロダクトイオンスペクトルフラグメント帰属 (正イオンモード)

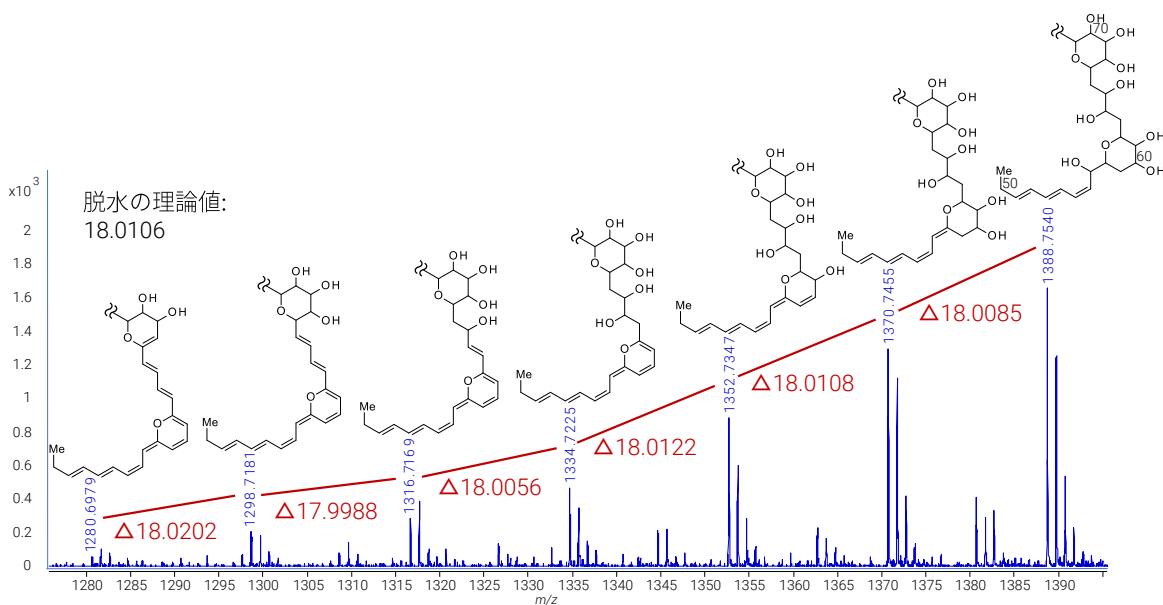


図4. ポリエンKシリーズ帰属と精密質量測定値

●構造未決定化合物オバトキシナ-IK2への適用

今回の手法がこれらの化合物の構造解明に有効であることが判明したので、これまでに構造の一部が決定できなかった化合物への適用を試みました。複雑なプロダクトイオンスペクトルを全て最初から解析するのは非常に困難ですが、前述のオストレオシンD解析結果をテンプレートと

して比較しながら解析することで効率的に解析を進めることができました。オバトキシナ(OVTa)は、イタリアのグループからも同一分子式有する化合物の構造決定報告 (P. Ciminiello, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2012; 134: 1869.) がありますが、HPLCでの保持時間が異なることから異性体と考えられ、生産する渦鞭毛藻が異なることからオバトキシ

ンa-IK2 (OVTa-IK2、沖縄伊計島で採集されたクローン株2番の意味)とIK2を付けてイタリア株からの化合物と区別します。表2に示すように、 $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$ の両方から組成式が $C_{129}H_{223}N_3O_{52}$ と決定されました。これはオストレオシンDと比較して、 C_2H_4 だけ大きく O_1 だけ小さいことに相当します。まず、負イオンモードでのプロダクトイオンスペクトルを、オストレオシンDの物と詳細に比較解析すると C_1-C_8 に相当するフラグメント (m/z 199.0985) が CH_2 分だけ大きいことから、生合成も考慮して C_3 にメチル基が置換していると推定されます。 $C_{41}-C_{42}$ が開裂した分子左側に相当するフラグメント (m/z 1031.6205) は C_2H_4 分だけ大きいことから、上記 C_3 メチル基以外に生合成も考慮してパリトキシンと同じ C_{26} メチル基と推定しました。 $C_{52}-C_{53}$ が開裂した分子右側に相当するフラグメント (m/z 1350.7044) は O_1 だけ小さいことから、 C_{53} より右側で脱水酸基が推定されます。次に、正イオンモードでのプロダクトイオンスペクトルを同様に比較解析しました。ポリエンJ (図3) からは脱水酸基が C_{17} 、 C_{19} 、 C_{20} のいずれかの特定はできませんが、パリトキシンやイタリア株との生合成を考慮して C_{17} 脱水酸基を推定しました。ポリエンKは脱水酸基が C_{69} か C_{70} のどちらかを示唆しており、別途行った実験結果よりイタリア株とのクロマトグラム上でのRTが異なることも考慮して C_{70} 脱水酸基を推定しました。それ以外の解析結果は前述の負イオンモード解析結果と矛盾する点は無く、補完的に構造を支持していました。

●他の類縁体への適用

オバトキシンド-IK2 (OVTd-IK2)、オバトキシネ-IK2 (OVTe-IK2)は今回の分離条件ではクロマトグラム上で分離できませんでしたので、混合物のままと同様の解析を試み、表2に示す構造と推定しました。

オストレオシンB (OSTB)はオストレオシンD類縁体として存在は知られていましたが、微量であることと、 1H -NMRシグナルの解析が困難で構造を解明できていませんでした。今回のこの手法を適用した結果、最も有効だったのは $C_{43}-C_{44}$ 結合と $C_{47}-O$ 結合とが同時に切れたフラグメント (m/z 1063.6149, $C_{52}H_{91}N_2O_{20}^-$, 2.0 ppm : 図2 フラグメントDに相当) と $C_{44}-C_{45}$ 結合と $C_{47}-O$ 結合とが同時に切れたフラグメント (m/z 1093.6241, $C_{53}H_{93}N_2O_{21}^-$, 3.2 ppm) を負イオンモードで帰属することができ、 $C_{44}-OH$ を推定できました。

どの化合物の場合も、正イオンモードを含めたその他のシグナルもこれらの構造を支持していました。また、参考文献2で示した研究成果ではこれまでに帰属できていなかった数多くのフラグメントを追加で帰属することができ、これらをテンプレートにすることで、今後ますます多くの類縁体の平面構造を推定する有効な手法となることが期待されます。

●Molecular Structure Correlator (MSC)の活用

一部の化合物のプロダクトイオンスペクトル解析には、MSC (MassHunter Qualitative Analysisソフトウェアに標準で付属)も活用しました。平面構造式を化学構造式描画ソフトで作成後にmolファイル形式で保存しておきます。プロダクトイオンスペクトルをMSCで解析すると、フラグメントが構造式中の部分構造に帰属されるかを自動的に検索することができます。

まとめ

Q-TOF LC/MSで測定したTargeted MS/MSスペクトル解析を複雑な天然物化学構造研究に応用した結果、正負イオンモードで異なるフラグメントが得られました。それらを詳細に解析することにより、限られた試料量からでも平面構造を推定することができました。今後、生合成研究や構造活性相関研究、生産株の分類にも活用されることが期待されます。

参考文献

1. Uchida H, Taira Y, Yasumoto T. Structural elucidation of palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* IK2 strain by complementary use of positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2013; 27: 1999-2008.
2. Terajima T, Uchida H, Abe N, Yasumoto T. Simple structural elucidation of ostreocin-B, a new palytoxin congener isolated from the marine dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, using complementary positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2018; 32: 1001 - 1007.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2018

Printed in Japan, August 2018

LC-MS-201808UD-001