

アプリケーションノート

精密質量スクリーニングおよび探索による植物アルカロイドの分析

Jeff Goshawk, Michelle Wood

Waters Corporation



法中毒学目的のみに使用してください。

要約

この試験では、UNIFI を用いた法中毒学スクリーニングアプリケーションソリューションを一部の植物アルカロイドに適用しました。サイエンスライブラリー項目の作成および更新が容易であることが明確に示されています。UNIFI 科学情報システム v1.8 を使用して MS^E データを解析したところ、これらの植物アルカロイドについて複数の付加イオンが検出されました。フラグメントマッチ機能によっても、高エネルギーイオンに部分構造を割り当てることができました。さらに、新規のディスカバートールによって未知化合物の解析が向上することが示されています。

アプリケーションのメリット

ライブラリーの作成および拡張が簡単にできることを実証するために、UNIFI¹ を用いた法中毒学スクリーニングアプリケーションソリューションを使用して植物アルカロイドを分析します。このアプリケーションノートでは、UNIFI 科学情報システム v1.8 内の最新の一連のディスカバートールの機能も紹介します。

はじめに

過去 10 年間で、多成分残留分析において、飛行時間型質量分析 (ToF-MS) が大きく普及しました。精密質量により物質同定の特異性が高まり、同位体データと組み合わせることで、可能性のある元素組成が示されます。元素組成式の提案は、化学構造を解析するための複雑な多段階プロセスの出発点になることがしばしばあります。

スクリーニングにおいて、精密質量測定は、ノミナル質量測定と比較して重要な利点があります。すなわち、レファレンス物質を必要とせずにスクリーニング分析法が実施できます。この特定のワークフローでは、理論的 (予想) 精密質量を、元素組成式から経験的に決定することができます。毒性学において、このワークフローは、新規向精神薬や、標準物質がまだ入手できない可能性のある新規物質や代謝物を「先を見越して」ターゲットにできる有用な手段になります。

UNIFI 毒性学サイエンスライブラリーを拡張するという現在行われているイニシアチブにより、一連の植物アルカロイドの分析が行われました。これらの窒素含有化合物は植物および植物材料に由来します。薬理活性があり、何百年もの間、医療目的や娯楽目的で使用されてきました。したがって、これらを分析することは法医学上の重要事項です。これらの物質の分析により、UNIFI 科学情報システム内のツールを、ターゲットの割り当ておよび構造解析の両方について評価する機会が得られました。

ACQUITY UPLC 条件

システム:	ACQUITY UPLC I-Class (FTN)
カラム:	ACQUITY HSS C ₁₈ 、2.1 × 150 mm、1.8 μm
分析時間:	15 分
バイアル:	Waters マキシマムリカバリーバイアル
カラム温度:	50 °C
サンプル温度:	10 °C
注入量:	10 μL
流速:	0.4 mL/分
移動相 A:	5 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 3.0 に調整済み)
移動相 B:	0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント:

時間	%A	%B
0.00	87	13
0.50	87	13
10.00	50	50
10.75	5	95
12.25	5	95
12.50	87	13

時間	%A	%B
15.00	87	13

MS 条件

MS システム:	Xevo G2-S QTof
イオン化モード:	ESI+
イオン源温度:	150 °C
脱溶媒温度:	400 °C
脱溶媒ガス:	800 L/時間
レファレンス質量:	ロイシンエンケファリン [M+H] ⁺ = m/z 556.2766
取り込み範囲:	m/z 50 ~ 1000
スキャン時間:	0.1 秒
キャピラリー電圧:	0.8 kV
コーン電圧:	25 V
コリジョンエネルギー:	ファンクション 1: 6 eV 10 ~ 40 eV のランプ
データ管理	UNIFI v1.8 を用いた法中毒学スクリーニングアプリケーションソリューション

実験方法

試料

植物アルカロイドであるアミグダリン、塩化ベルベリン、プファリン、クマリン、ジギトキシン、ギトキシン、ラナトシド C、ネリイホリン、 α -ソラニン は Sigma-Aldrich (英国、プール) から固形物として入手しました。

サンプル前処理

植物アルカロイドの個別のストック溶液を、まずメタノールで濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈して調製しました。これらの溶液は、使用時まで $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保管しました。Tof-MS 分析の前に、これらのストック溶液を移動相 A でさらに希釈して、濃度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の注入用サンプルを調製しました。

結果および考察

分析の前に、9 種のアルカロイドの名前を入力するだけで、植物アルカロイドのみの新規 UNIFI サイエンスライブラリーが作成されました。各物質の構造を記載した MOL ファイルを、ライブラリーの各エントリーに追加しました (図 1)。植物アルカロイドの個々の溶液を注入し、UNIFI 法中毒学スクリーニングアプリケーションソリューションに付属の標準のスクリーニング条件を使用してデータを取り込みました¹。続いて、UNIFI 科学情報システムを使用してこれらのデータを解析し、新規の植物アルカロイドライブラリーに対してスクリーニングしました。

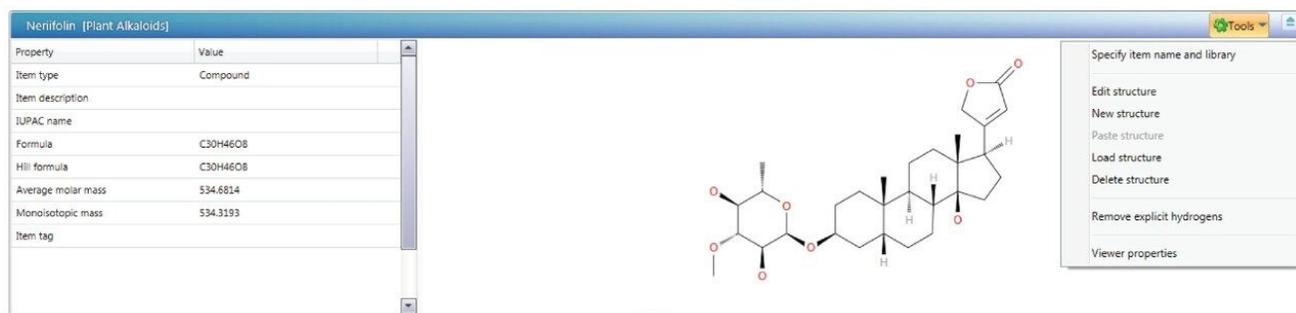


図 1. ネリイホリンのライブラリーエントリーの作成。Load structure (構造を読み込む) で既存の MOL ファイル構造を追加したり、New structure (新規構造) で標準の化学描画パッケージにより作成してから追加したりすることができます。

in-silico フラグメンテーション手法の適用による同定

各植物アルカロイドの存在は、プロトン化したプリカーサーイオンの質量精度と、各物質の構造から自動的に生成された理論上のフラグメントイオンを組み合わせることで確認され、高エネルギースペクトル中のイオンとマッチしました。

図 2 に、UNIFI に表示された α -ソラニンの同定を示します。Component Summary (成分サマリー) には、このアルカロイドの同定に関連する情報が表示されます。これには、実測 m/z およびその予想 m/z 値からの偏差、 m/z 分布と強度分布の両方に関する実測同位体パターンおよび理論上の同位体パターンの差、実測保持時間、検出された理論上のフラグメントイオンの数、検出された化合物に関連するすべての低エネルギーイオンの存在量を表す検出器でのカウントが含まれます。

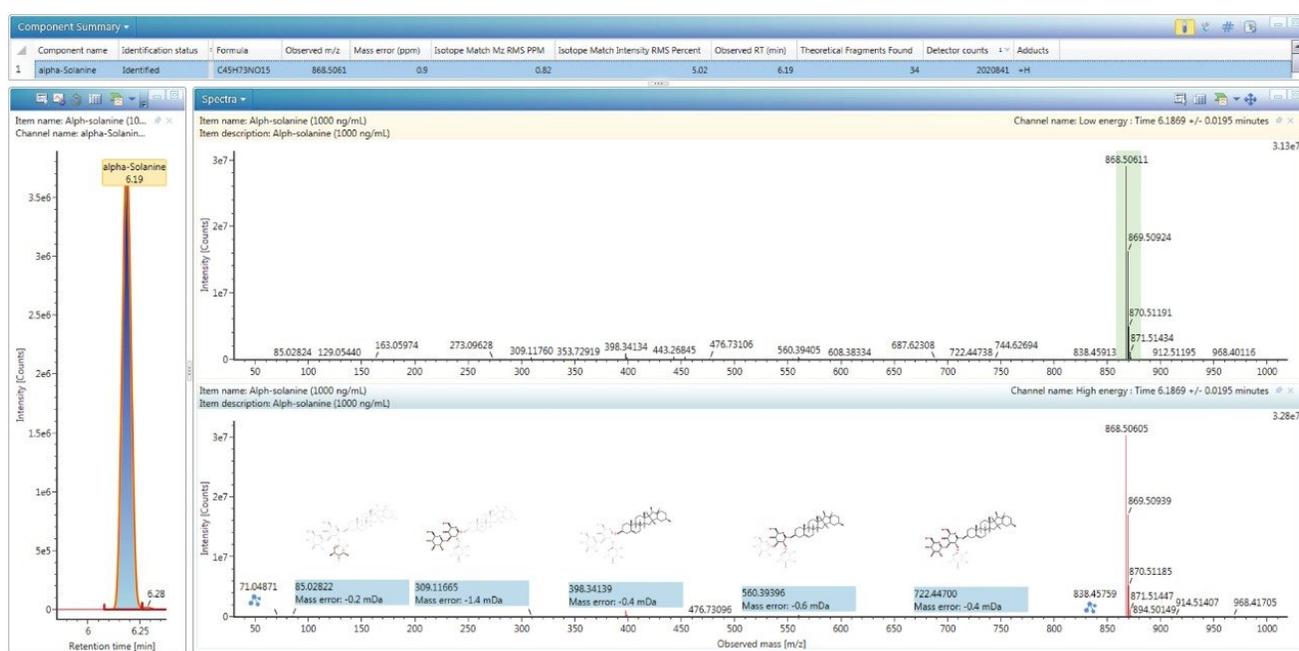


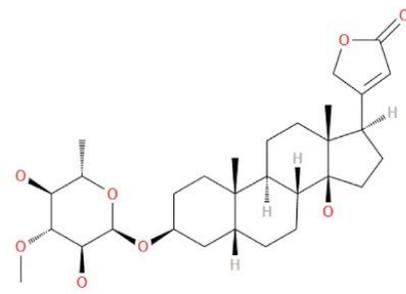
図 2. UNIFI 科学情報システムにおける α -ソラニンの同定

ライブラリーエントリーの更新

すべてのアルカロイドが、プリカーサーイオンおよび解析中に生成した理論上のフラグメントイオンの質量精度に基づいて同定されました。同定に際して、保持時間を各物質に関連付けました。UNIFI では、ライブラリーエントリーを分析から直接更新し、割り当てられた各付加イオンおよびフラグメントイオンの予想保持時間と予想 m/z 値を含めることができます。更新後は、通常のライブラリーエントリーに図 3 に示すネリイホリンの情報と同様の情報が含まれます。後続の分析では、この追加情報を使用して、その物質をターゲットにすることができます。

Nenifolin [Plant Alkaloids] Tools

Property	Value
Item type	Compound
Item description	
IUPAC name	
Formula	C30H46O8
Hill formula	C30H46O8
Average molar mass	534.6814
Monoisotopic mass	534.3193
Item tag	



Detection results

Priority	Intensity	Formula	Neutral Mass (Da)	Adduct	Charge	Fragmentation type	Expected m/z	Expected RT (min)	Ionization technique	Detail type
1	5769486		534.3193	+H	1	None	535.3265	9.300	ESI+	MSe
5	1166637	C23H31O2			1	CID	339.2319	9.300	ESI+	MSe
6	864505	C23H35O4			1	CID	375.2530	9.300	ESI+	MSe
7	676380	C23H33O3			1	CID	357.2424	9.300	ESI+	MSe
8	308892	C4H5O2			1	CID	85.0284	9.300	ESI+	MSe
9	131214	C30H45O7			1	CID	517.3160	9.300	ESI+	MSe
10	117844	C5H7O2			1	CID	99.0441	9.300	ESI+	MSe
11	108359	C30H43O6			1	CID	499.3054	9.300	ESI+	MSe
12	91115	C15H19O2			1	CID	231.1380	9.300	ESI+	MSe
13	82439	C6H9O3			1	CID	129.0546	9.300	ESI+	MSe
14	52590	C6H7O2			1	CID	111.0441	9.300	ESI+	MSe
15	49419	C4H7O2			1	CID	87.0441	9.300	ESI+	MSe
16	45814	C9H13			1	CID	121.1012	9.300	ESI+	MSe
17	45446	C22H31O			1	CID	311.2369	9.300	ESI+	MSe

図 3. ネリイホリンのライブラリーエントリー。複合画面の下の部分に、プリカーサーイオンとフラグメントイオンの予想保持時間および予想 m/z 値が入力されています。

複数の付加イオン

この試験で調査したその他のアルカロイドの 1 つであるギトキシンのデータを図 4 に示します。この物質に割り当てられた低エネルギーイオンは、プロトン化同位体クラスターに対応しており、スペクトル内で緑色で強調表示しています。ギトキシンのプロトン化同位体クラスターについて測定された検出器でのカウントは 568 です。この高エネルギースペクトルには、ギトキシンの部分構造が注釈付けされています。これは、UNIFI によって自動的に決定され、フラグメントイオンとして高エネルギースペクトルピークに関連付けられています。



図 4. UNIFI 科学情報システムにおけるギトキシンの同定

この物質の低エネルギースペクトルのさらなる調査により、一部のイオンがギトキシンの他の付加イオンに対応する可能性があることが明らかになりました。そのため、データを再解析し、プロトン化分子種に加えて、 $[\text{NH}_4]^+$ 、 $[\text{Na}]^+$ 、 $[\text{K}]^+$ の各付加イオンをターゲットにしました。図 5 に、再解析後に各付加イオンに割り当てられた低エネルギーデータの同位体クラスターの詳細を示します。ギトキンへの追加の付加イオンの割り当ては、検出器でのカウントに反映され、プロトン化付加イオンの同位体クラスターから決定された 568 から 118680 に増加しました。この分析の他の物質についても、同様の結果が得られました。

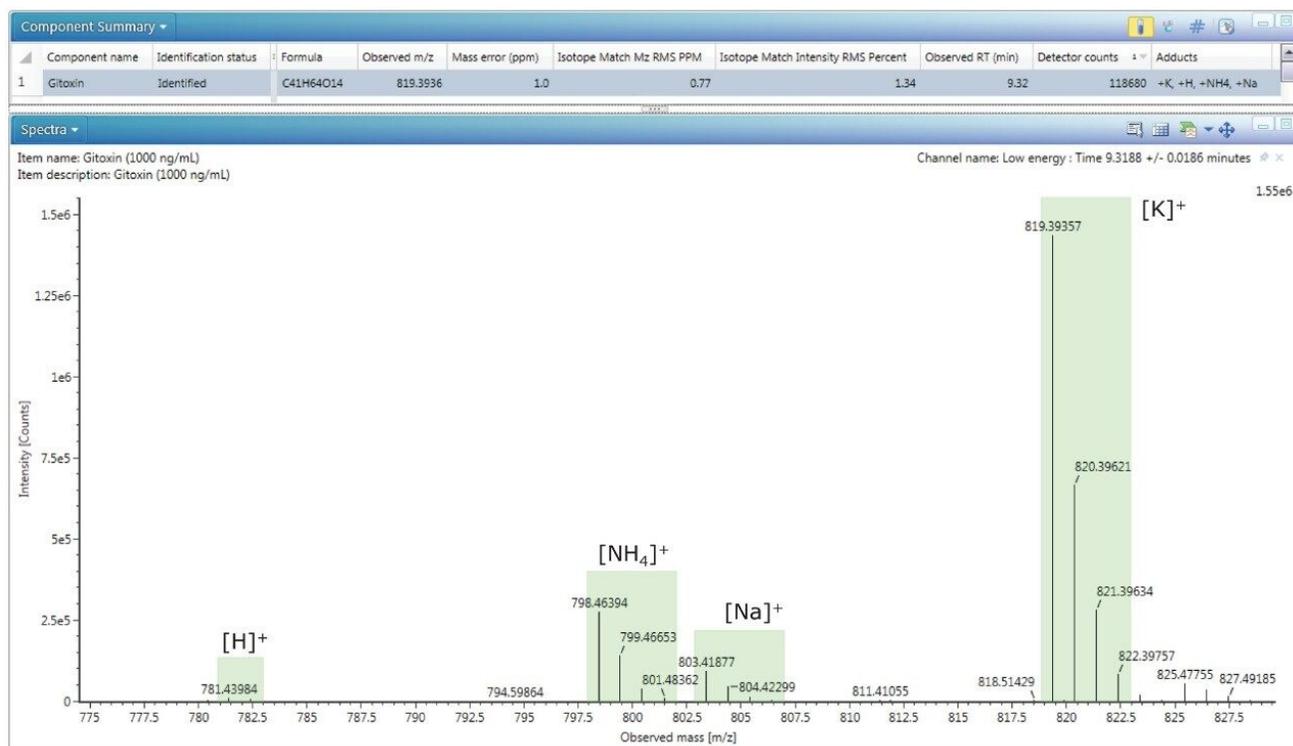


図 5. ギトキシンに対する複数の付加イオンの割り当て

ディスカバーツール

UNIFI 科学情報システム v1.8 のもう 1 つの新機能はディスカバーツールです。これにより、元素組成、ライブラリー検索、フラグメントマッチ機能が単一ステップのプロセスとしてつなぎ合わされ、サンプル内の予期しなかった物質のアイデンティティ取得がより簡単になります。ディスカバーツールの実行に使用したパラメーターの詳細を図 6A ~ D に示します。

図 6A に示す最初のパラメーターのセットは、各成分について返される元素組成の最大数と、各元素組成について返されるライブラリーヒットの数を制御します。選択した各成分について、実測 m/z 値が元素組成アプリケーションに送信されます。そのパラメーターが図 6B に示されています。次に、元素組成アプリケーションによって返された各化学式は、選択したライブラリーのリストに自動的に送信されます。このライブラリーは、UNIFI サイエンスライブラリーか ChemSpider (インターネット接続されている場合) のいずれかに属しています。ChemSpider ライブラリーを選択している場合のダイアログが図 6C に表示されています。

ライブラリー検索から返された各化学式のすべてのライブラリーヒットに関連付けられた MOL ファイル形式の構造がある場合は、自動的にフラグメントマッチアプリケーションに送信されます。

フラグメントマッチアプリケーションでは、図 6D に表示されているダイアログで選択したパラメーターを適用して、各構造に対して系統的な結合切断が行われ、理論上の部分構造の m/z 値が測定された高エネルギーフラグメントイオンにマッチングされます。マッチしたフラグメントイオンの数と、それらのマッチが占める高エネルギースペクトルの強度の割合の両方が決定されます。

A

Discovery Parameters

Discovery | Elemental Composition | ChemSpider | Fragment Match

Elemental Composition

ChemSpider Scientific Library

Minimum i-FIT Confidence: 10 % Minimum citations: 0

Number of compositions: 5 Number of hits: 50

Start Cancel

B

Discovery Parameters

Discovery | Elemental Composition | ChemSpider | Fragment Match

Composition

Automatic elements selection

Select elements... Use formula from parent...

Selected elements: C, H, N, O, S, Cl, Br

Adducts

Automatic adducts selection

Selected adduct: +H Select adduct...

Total adducts charge: 1

m/z Tolerance: 2 mDa Use Senior rule

Electron state: Even Use Carbon/Hydrogen ratio filter

Minimum DBE: -1.5 Use Carbon/Hetero-atom ratio filter

Maximum DBE: 50 Use multi-atom filter

Number of isotopes before selected peak: 0

Number of isotopes to use: 3

Start Cancel

C

Discovery Parameters

Discovery | Elemental Composition | ChemSpider | Fragment Match

Available libraries:

- A&J Pharmtech
- A1 BioChem Labs
- AZZ Chemical
- Abacipharm
- Abblis Chemicals
- Abcam
- ABI Chemicals
- Abmole Bioscience

Selected libraries:

- FDA UNII - NLM

Start Cancel

D

Discovery Parameters

Discovery | Elemental Composition | ChemSpider | Fragment Match

Use smartsScores

Multiple: 4 Alpha: 5 DBE minimum: -1.5 Mode: Automatic

Phenyl: 8 Other: 1 Hydrogen difference: 6 DBE maximum: 50

Aromatic: 6 Bonds: 4 Allow scores below: 8 Neutral: On Filter peaks by intensity

Ring: 2 Hetero: 0.5 Delta (mDa): 2 H Penalty: 0 Number of peaks: 0

Start Cancel

図 6. UNIFI のディスカバーツール。A) 一般ディスカバーツールパラメーター。B) 元素組成パラメーター。C

) ChemSpider パラメーター。D) フラグメントマッチパラメーター。

説明の目的で、ターゲット分析でアミグダリンと同定された候補成分を、ディスカバーツールに送信しました。図 6A ~ D に示すパラメーターに関してアプリケーションを実行した際の結果を図 7 に示します。

ディスカバーツールに送信された成分は、候補質量 m/z 458.1649 でした。得られた結果は、 m/z 458.1649 について、i-FIT 信頼度が 89% の 1 つの元素組成 $C_{20}H_{27}NO_{11}$ と判定されたことを示しています。この元素組成は、ChemSpider 内の FDA UNII - NLM ライブラリーに自動的に送信され、アミグダリンのヒットとともに別名、構造、引用回数リストが返されました。図 7 に示すように、この構造がフラグメントマッチとともに自動的に使用され、該当する部分構造が、候補質量 m/z 458.1649 に関連する高エネルギースペクトルに割り当てられています。部分構造によってマッチした高エネルギーフラグメントの数と、それらのマッチが占める高エネルギースペクトルの強度の割合が、ライブラリーヒットについて表示されています。

さまざまな成分、元素組成、ライブラリーヒットに関するこれらの情報にアクセスすることにより、サンプル中の予期しなかった物質のアイデンティティーに関して、情報に基づく判断を下すことができます。

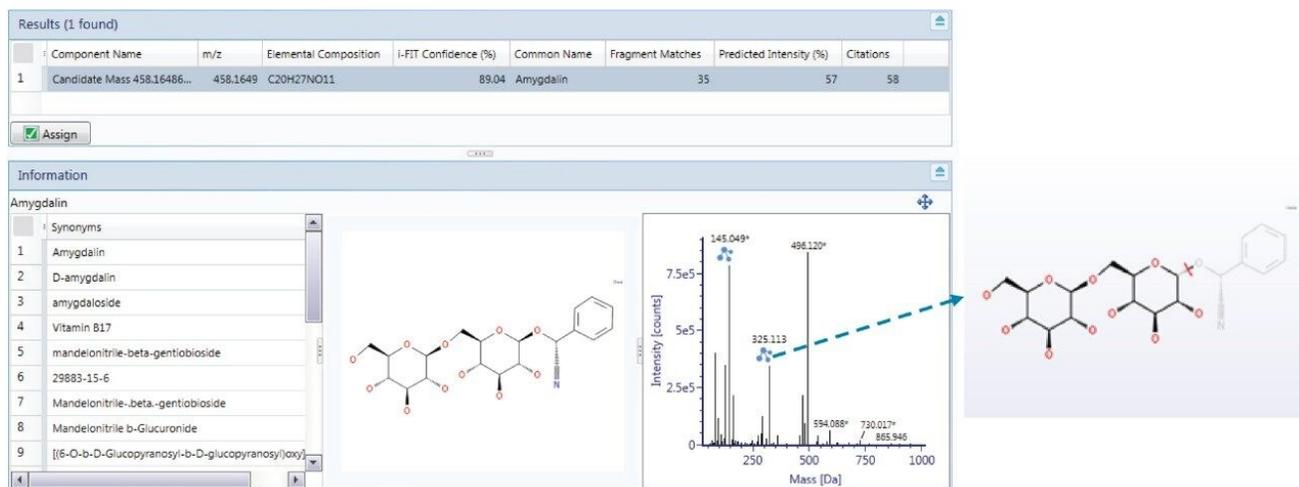


図 7. ディスカバーツールでの代表的な結果

結論

本研究では、UNIFIを用いた法中毒学スクリーニングアプリケーションソリューション¹を一部の植物アルカロイドに適用しました。サイエンスライブラリー項目の作成および更新が容易であることが明確に示されています。UNIFI 科学情報システム v1.8 を使用して MS^E データを解析したところ、これらの植物アルカロイドについて複数の付加イオンが検出されました。フラグメントマッチ機能によっても、高エネルギーイオンに部分構造を割り当てることができました。さらに、新規のディスカバートールによって未知化合物の解析が向上することが示されています。

参考文献

1. Forensic Toxicology Screening Application Solution.Waters Brochure (P/N 720004830EN).

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

UNIFI を用いた法中毒学スクリーニングアプリケーションソリューション <<https://www.waters.com/134779723>>

オンラインで購入可能

ACQUITY UPLC HSS C18 カラム、100Å、1.8 μm、2.1 mm × 150 mm、1/pkg <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186003534>>

720005461JA、2015 年 7 月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシーポリシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [法的通知およびプライバシー通知](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)