

イオンパズル

An Unprecedented Gigantic Ion

大橋陽子

Yoko Ohashi

理化学研究所 脳科学総合研究センター

〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

TEL 048-467-6317

E-mail: ohashi@brain.riken.jp

1. Stage 0: ghost ion の出現

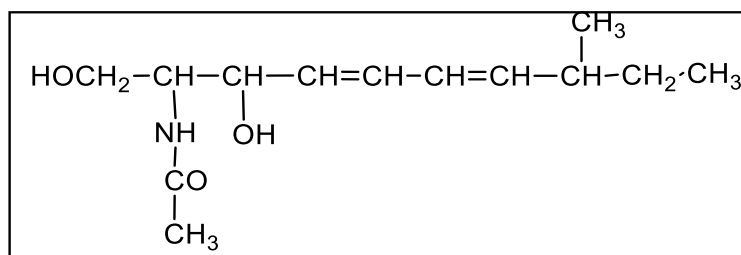
秋山央子(HA)らは最近ニワトリ胚脳組織より、グルコース化されたコレステロールだけでなく植物性ステロールが存在(混在)していることを発表した¹⁾。この意外な発見には、実はもう一つの構造決定が潜んでいた。

LCによって精製を重ねた活性画分のMALDIMSにおいて最高強度を示すイオンの説明がつかなかった。予想通りのコレステロールのナトリウム化分子 $[M+Na]^+$ m/z 571に対し、そのイオンは m/z 242 を示し、窒素を含まないコレステリルグルコシドのフラグメントイオンではないことは一見して明らかであり、当然のことながら m/z 571 をブリーカーとするプロダクトイオンとしては観測されなかった。また、このイオンはアンモニウム塩を含む溶媒を用いたESIでは観測されないことも注意を引いた。このイオンは試料のニワトリ脳に存在する未知の含窒素化合物由来であろうか、それとも外来性の、いわゆるコンタミであろうか？脳から抽出されたものであれば、LCに対する挙動がよほどコレステリルグルコシドに似ていることになる。事実脊椎動物の脳内には大量のスフィンゴ脂質が存在していて、コレステリルグルコシドを単離する際セラミドとの分離は非常に困難であった。(Fig. 1)

2. Stage 1: セラミド？

この未知物質の構造を調べるべくJEOLにSpiral TOF-TOFによるプロダクトイオンスペクトル測定を依頼した。低質量側に Na^+ も Li^+ も観測されないことから m/z 242 をプロトン化イオンと考え、分子量は241と推定した。脳内にありそうな窒素化合物の構造としてまずセラミドを仮定したが、これは中枢神経系によく見られる通常のセラミドの半分以下の分子量である。プロダクトイオンに矛盾しないフラグメンテーションスキームを考えて数合わせを行い、辿り着いた構造式をScheme 1に示す。この分子式に対する天然同位体存在比と測定されたMSスペクトルの同位体パターンは許容できる範囲で重なり

ると大橋陽子(YO)には思えた。



Scheme 1 ante-iso type ceramide

(d11:2/C2:0) $C_{13}H_{23}NO_3$ MW 241.2

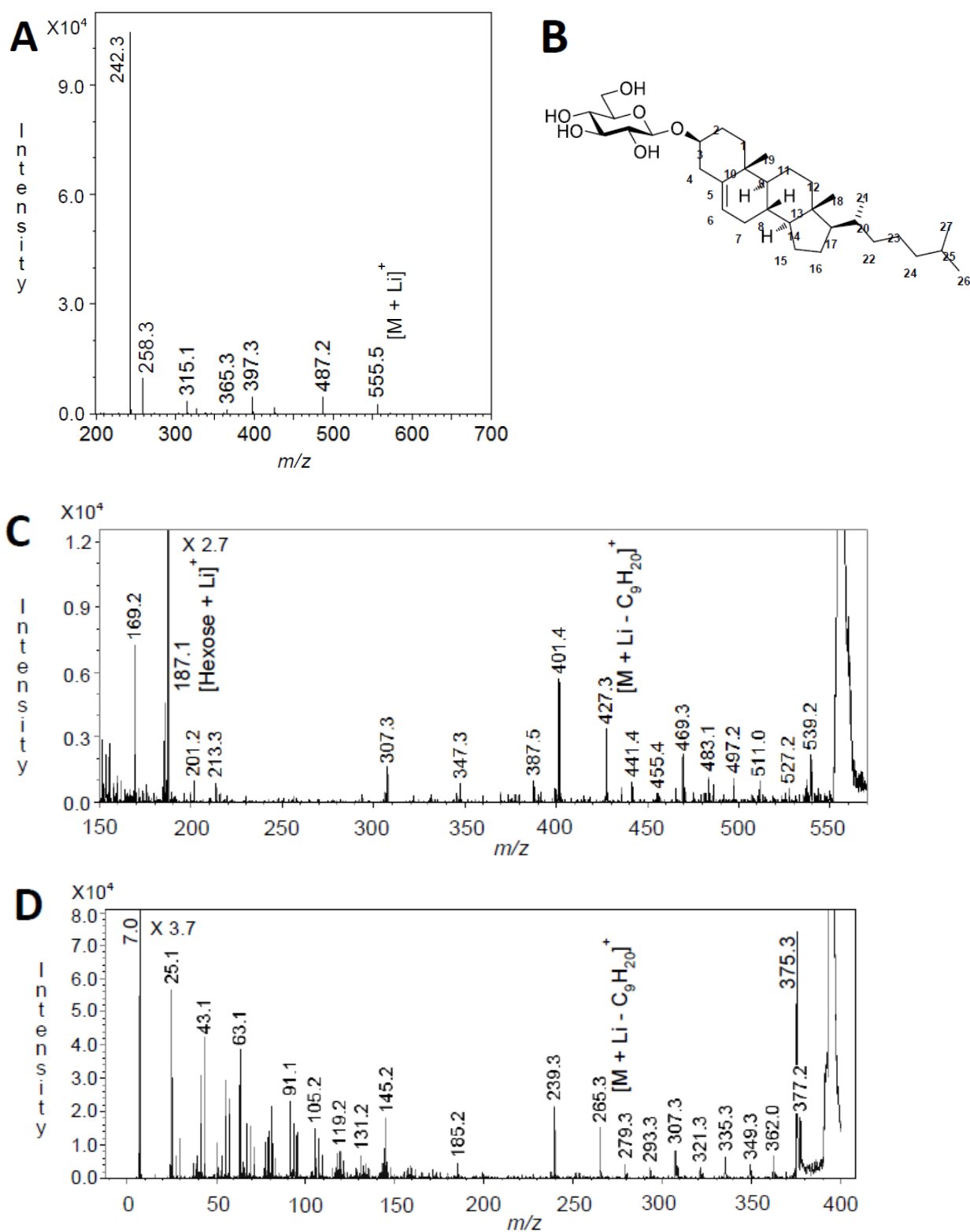


Fig. 1 (+) MALDI Spiral TOF-TOF of a typical fraction from chicken embryonic brain. .A) MS1 spectrum; B) proposed structure of the active component. C) HE-CID MS/MS of the sample having [M + Li]⁺ at m/z 555.5 as the precursor ion. D) HE-CID MS/MS spectrum of cholesterol standard having [M + Li]⁺ m/z 393.4 as the precursor ion. Reproduction from ref. 1 with minor modification.

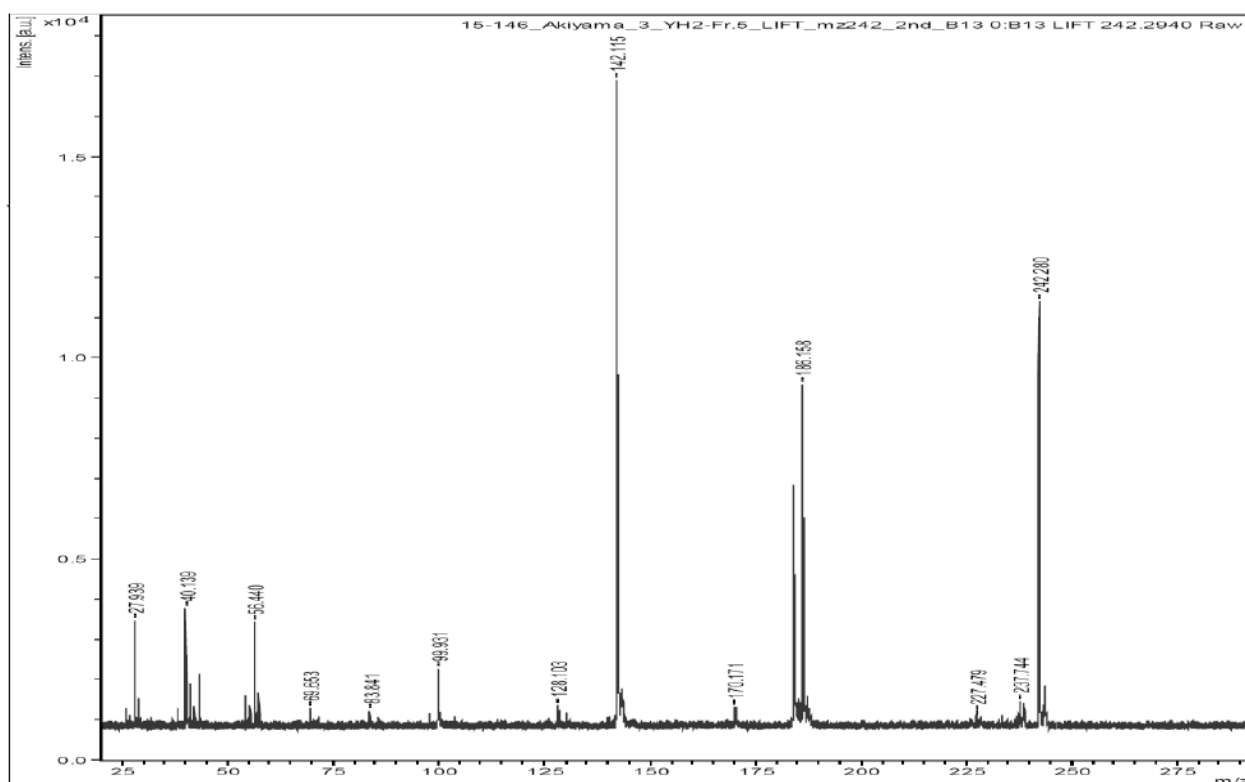


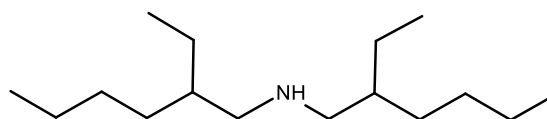
Fig. 2. MALDI MSMS of the YH2-Fr.5 fraction having m/z 242.3 as the precursor ion with DHB in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, LiCl in MeOH.

Stage 2 新規脳内アミン？

ところが、超短鎖のセラミドではないかとの YO の推理に対し今回の Spiral MALDI TOF-TOF の測定者 JEOL の伊藤喜之博士(YI)から異論が出た。

- 酸素が 3 個もある分子に Li 付加が起きないとは考え難い。
- しかし酸素を複数含むセラミドに対応するような組成は候補に挙がらない。

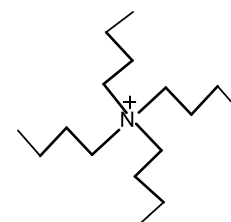
YI 氏は文献検索の結果ビス(2-エチルヘキシル)アミンを候補として挙げた。この構造は酸素を持たないので、アルカリ金属が付加しない理由も納得できるとのことであった。しかし、市販標品の m/z 242 をプリカーサーイオンとする MS2 スペクトルと未知試料の同様スペクトルとは残念ながら異なっていた。(Fig. 3)



bis(2-ethylhexyl)amine MW 241

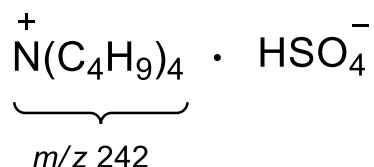
Stage 3 tetrabutylammonium cation!

しかしこのすぐ後、YI 氏は全く偶然の機会に m/z 242 という (+)MALDI イオンに遭遇したそうである。そのサンプルは右図に示すようなテトラブチルアンモニウムを含んでいて、その第四級アンモニウムカチオンが m/z 242 を示していた。そして、衝撃的なことにその MS2 はまさに HA の活性物質からどうしても除ききれなかった m/z 242 イオンのプロダクトイオンスペクトルと区別がつかなかった。YI 氏は確認のためにテトラブチルアンモニウム



Tetrabutylammonium cation

ウムを含む市販標品として色素増感型太陽電池に用いられる Ru 色素、N719 およびフッ化テトラブチルアンモニウムをサンプルとして m/z 242 を検出し、それらの MS2 スペクトルを測定して先に HA らが難渋していた m/z 242 の正体がテトラブチルアンモニウムカチオンであることを突き止めた。この段階ではアニオン部分の構造は不明であった。しかし以前に LCMS の溶媒添加物として硫酸水素テトラブチルアンモニウム (tetrabutylammonium hydrogensulfate) を用いていたことが分かった。巨大なイオンの正体はこれであった。



Stage X in-beam EI

YO がこの顛末を話すと、あ、それ、とったことがある、と云い出した者がいた。In-Beam EI で第四級アンモニウムがどこまで測定できるか、片端から験していた大橋守は 35 年以上前にすでにテトラブチルアンモニウムブロマイドの MS1 および MS2 スペクトルに出会っていた²⁾。

学んだこと：

実験事実が先！ フラグメンテーションは未知物質の構造推定に対してきわめて有用であり、かつ推定した構造とフラグメンテーションが矛盾しないことは必要である。しかし、マスのみを過信してはならない。

Reference:

1. Hisako Akiyama, Kazuki Nakajima, Yoshiyuki Itoh, Tomoko Sayano, Yoko Ohashi, Yoshiki Yamaguchi, Peter Greimel, and Yoshio Hirabayashi, *J. Lipid Res.* **57**, 2061-2072 (2016) “Aglycon diversity of brain sterylglucosides: Structure determination of cholesteryl- and sitosterylglucoside”.
2. Mamoru Ohashi, Robert P. Barren, and Walter R. Benson, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 3943-3945 (1981): “Electron-Impact-Induced Fragmentation of Quaternary Ammonium Cations”

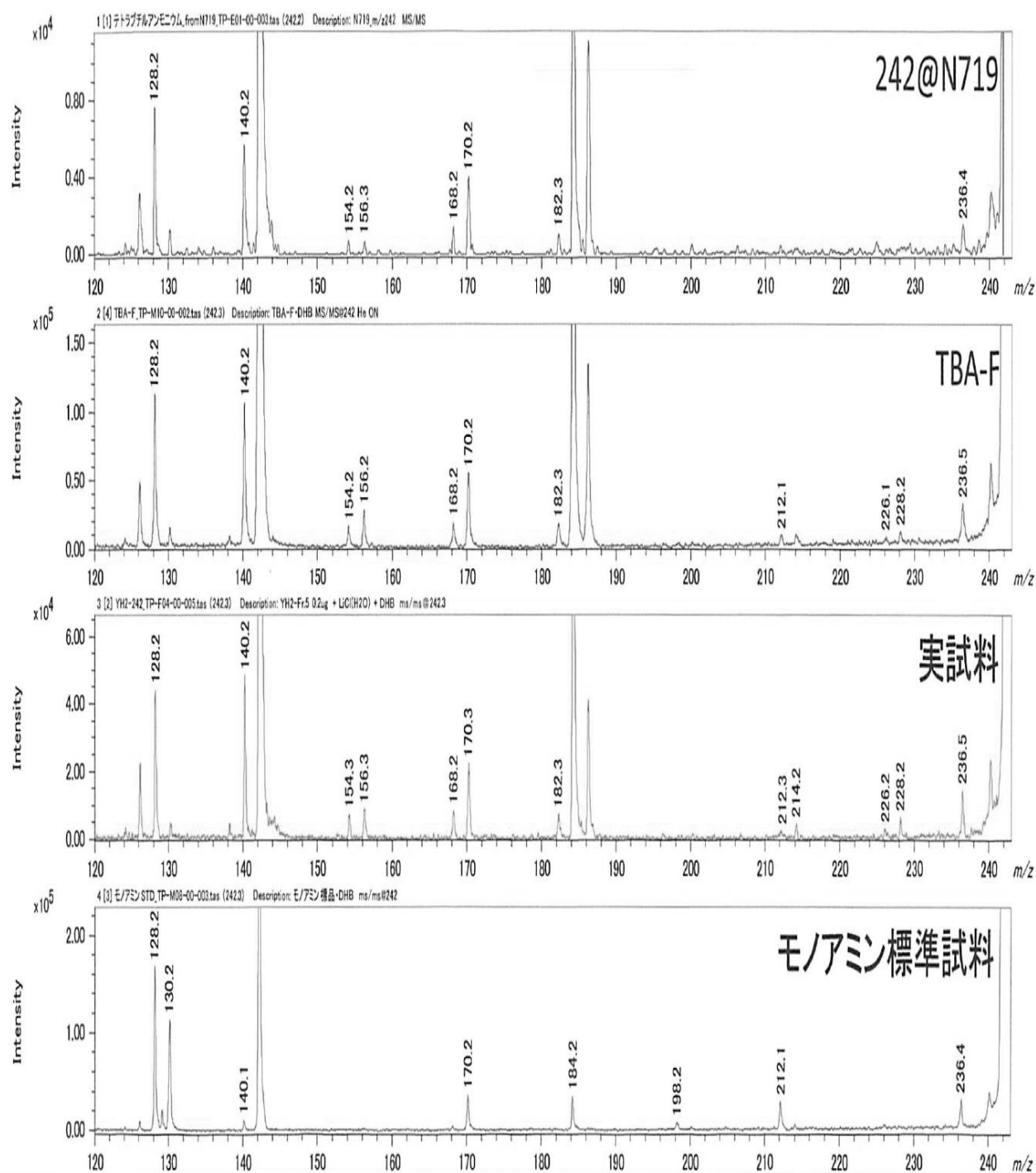
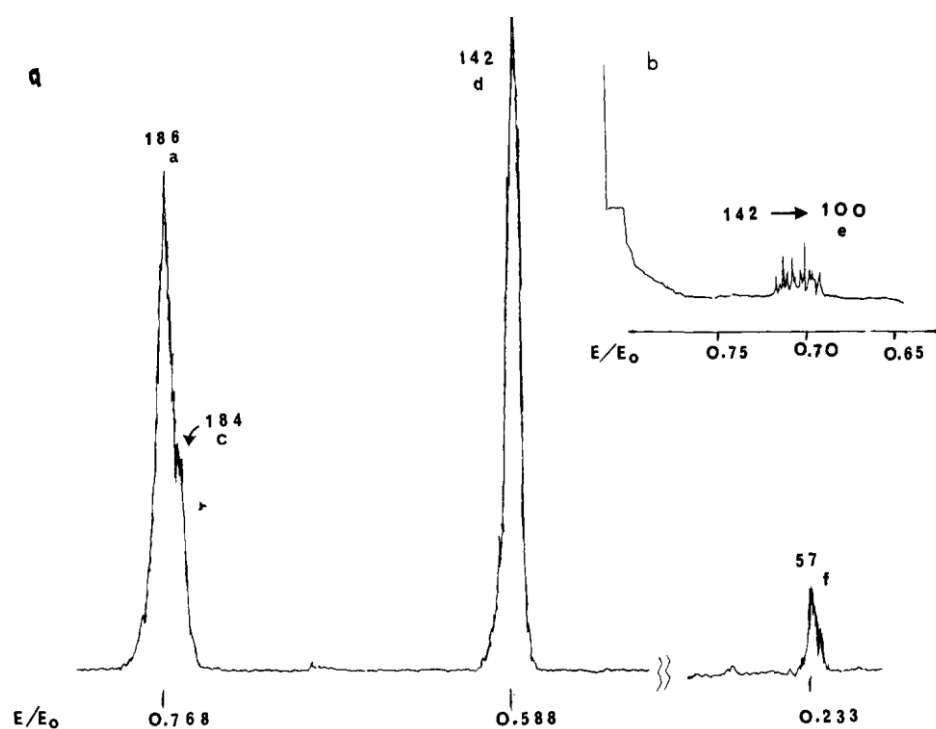
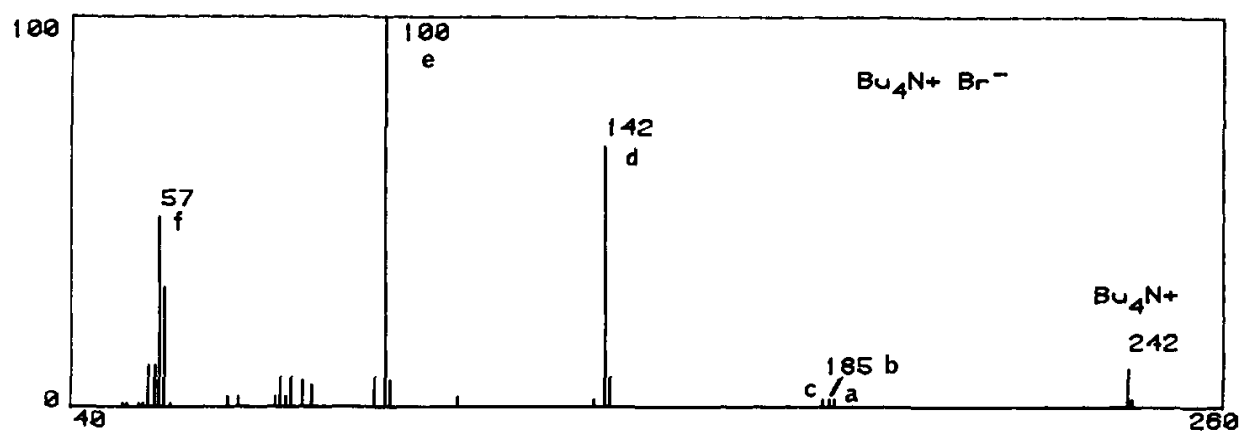


Fig. 3 Comparison of the three MS2 spectra in the (+)MALDI mode having an ion at m/z 242 as the precursor. Top panel: Ru-dye N719. Second panel: Tetrabutylammonium fluoride. Third panel: Unknown sample in question. Bottom panel: Bis(2-ethylhexyl)amine.



MIKE spectra of tetrabutylammonium cation: (a) metastable transitions from Bu_4N^+ ; (b) a metastable transition leading to the base peak (m/z 100) from ions at m/z 142.

Fig. 4 In-beam EI (upper) and MIKES (lower) spectra of tetrabutylammonium bromide (80 eV). Copied from ref. 2 with minor modification.