大気圧化学イオン化法を用いた質量分析法による不斉認識

Chiral Recognition by Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry

橋本圭二^{a)}・隅田芳男^{a)}・寺田俊二^{a)}・岡村公生^{*b)}

Keiji HASHIMOTO, Yoshio SUMIDA, Syunji TERADA, and Kimio OKAMURA

(平成4年11月2日受理)

In the APCI mass spectra of optically active methyl mandelate [M], a difference, which reflects molecular chirality, in the relative intensity of MH^+ and diastereomeric adduct ion $[M+XH]^+$ was observed when an optically active 1-phenylethylamine [X] was used as reagent gas. To investigate whether this difference is caused by enantio-selective ion-molecular reaction occurring in the gas phase, X-ray crystallography and MNDO-PM3 were performed to estimate the structure of both adduct ions. The estimated structures showed a difference of 2.2 kcal/mol in terms of heat of formation and the tendency agreed with the result of mass spectra. The energetic difference was due to the difference of hydrogen bonding force formed adduct ion and is caused by steric effects.

1. 緒 言

液体クロマトグラフィー (LC) と質量分析計 (MS) の結合による分析法 (LC/MS) の最近の進歩はめざましいものがあり、有機化学の分野のみならず、生物学・医学・薬学・環境など多方面で応用され成果を挙げつつある。LC の分野では、キラルな固定相の研究が盛んに行われており¹⁾、いくつかの光学分割用カラムも市販されるようになった。また質量分析の分野では、HPLC の分析条件を損なうことなく質量スペクトルを感度良く測定ができ、分子量をはじめとした構造情報を与えてくれるイオン化法 (例えば Thermospray (TSP)²⁾、大気圧化学イオン化 (APCI)³⁾、Frit-FAB⁴⁾、Electrospray (ESP)⁵⁾ など) が開発されている。しかしながら、質量分析法は化合物のキラリティーに関する情報を与えてくれることが少ない。

大気圧化学イオン化法 (APCI)³⁾ は、試料溶液を大気圧下でのコロナ放電によりイオン化する方法であり、感度・再現性・操作性などの点で LC/MS のイオン化法として優れた特徴を持つ。

APCI では LC の移動相などを反応試薬としたイオン-分子反応によってイオン化がなされるが、このイオン-分子反応を基にしたイオン化で、光学活性な反応試薬を使用して光学活性な化合物の質量スペクトルを測定する時、ある種のイオンで試料分子のキラリティーを反映した特徴的な差が観測されることが報告されている⁶⁾。また最近になって、高速原子衝撃イオン化 (FAB) 質量分析で同様にキラリ

^{a)} 京都薬科大学 (〒607 京都市山科区御陵中内町 5)

Kyoto Pharmaceutical University

(Nakuauchicho, Misasagi, Yamashina, Kyoto 607, Japan)

^{*b)} 田辺製薬(株)有機化学研究所 (〒335 戸田市川岸 2-2-50)

Organic Chemistry Research Laboratory,

Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

(2-2-50, Kawagishi, Toda, Saitama 335, Japan)

ティーに起因したスペクトル差についての報告もある⁷⁾。

著者らは、LC/MS のイオン化法の一つとして利用されている APCI 法で、光学活性な反応試薬 [X] として (R)- もしくは (S)-1-フェニルエチルアミン (以下 (R)-, (S)-PEA) を用い、光学活性な試料 [M] として (R)- もしくは (S)-マンデル酸メチル (以下 (R)-, (S)-MAM) の質量スペクトルを測定する時、MAM のプロトン化分子 $[MH]^+(m/z\ 167)$ と MAM と PEA の付加イオン $[M+XH]^+(m/z\ 288)$ に、分子のキラリティーを反映したと考えられる強度差が観測されることを報告した⁸⁾。この強度差が反応試薬と試料のキラリティーに起因するものであることを証明すべく、モデル化合物として、(S)-PEA の (S)-マンデル酸塩と (R)-PEA の (S)-マンデル酸 (以下 MA) 塩の X 線結晶構造解析を行った。また半経験的分子軌道法を用いてこの付加イオンの構造を推定し、熱力学的考察を行った。その結果、APCI 質量スペクトルにおいて、光学対掌体の不斉認識の可能性を示唆する結果を得たので報告する。

2. 実 験

2.1 装 置

a) 液体クロマトグラフ-質量分析計

M-1000 型 LC/API 質量分析計 ((株)日立製作所製) に液体クロマトグラフ L-6200 /L-6000 型溶媒コントローラー ((株)日立製作所製) を結合させたものを使用した。LC カラムは Nucleosil C₁₈ の 4.6 mm×150 mm または 4.6 mm×10 mm のものを用いた。移動相は 4 mM 濃度の光学活性な PEA のメタノール溶液-メタノール=6:94 を用い、流量は 1 ml/min とした。また、APCI 装置の中間電極は取り外して実験を行った。分析試料として光学活性な MAM のメタノール溶液 (0.35 mg/ml) を作成し、2 μ l を試料注入し分析した。

b) X 線結晶構造解析

四軸型自動回折計 AFC-5R (理学電機(株)製) により、X 線源に Cu-K α 線 (1.5418 Å) を用いた。約 20 の回折点から結晶格子を組み立て、結晶格子定数の精密化を $30^\circ \leq 2\theta \leq 60^\circ$ の範囲の反射約 20 点で行い、 $2\theta \leq 120^\circ$ の範囲で 3 次元強度データを測定した。構造解析は直接法 (SIR85⁹⁾) で行い、ブロック-対角マトリックス最小自乗法で原子パラメータの精密化を行った。温度因子は、非水素原子はすべて非等方性温度因子として扱った。水素原子は、差フーリエ合成で観測できたものについては等方性温度因子の扱いとして精密化計算に含め、その他は化学的に妥当な位置に固定し、精密化計算には含めなかった。原子散乱因子は、すべて文献値¹⁰⁾を用いた。

c) 分子軌道法

MNDO-PM3 法¹¹⁾を適用し、構造最適化はエネルギー勾配法により評価した。

X 線構造解析、ならびに分子軌道計算はいずれも NEWS-3860 (SONY 社製) で行った。

2.2 試薬・単結晶

移動相メタノールは液体クロマトグラフ用 (和光純薬) を用いた。その他の試薬はいずれも市販 (Aldrich) のものを再蒸留もしくは再結晶して使用した。

(R)-PEA $[\alpha]^{20} + 36.5^\circ (c=2, \text{C}_2\text{H}_5\text{OH})$,

(S)-PEA $[\alpha]^{20} - 38.5^\circ (c=2, \text{C}_2\text{H}_5\text{OH})$,

(R)-MAM $[\alpha]^{20} - 144.0^\circ (c=1, \text{CH}_3\text{OH})$,

(S)-MAM $[\alpha]^{20} + 144.0^\circ (c=1, \text{CH}_3\text{OH})$,

(R)-MA $[\alpha]^{20} - 153.0^\circ (c=2, \text{H}_2\text{O})$,

(S)-MA $[\alpha]^{20} + 153.0^\circ (c=2, \text{H}_2\text{O})$

単結晶は、いずれもエタノール/エーテル系で蒸気拡散法にて作成した。

結晶データ: (S)-PEA, (S)-MA; $a=12.967(2)$, $b=6.823(2)$, $c=8.413(2)\text{\AA}$, $\beta=91.30(1)^\circ$, $U=744.1(3)\text{\AA}^3$, P2₁, $Z=2$, 最終 R 値=0.074. (R)-PEA, (S)-MA; $a=14.956(1)$, $b=16.324(2)$, $c=6.439(2)\text{\AA}$, $\alpha=97.04(1)$, $\beta=99.25(1)$, $\gamma=75.11(1)^\circ$, $U=1491.1(3)\text{\AA}^3$, P1, $Z=4$, 最終 R 値=0.044.

3. 結果と考察

3.1 測定条件設定と質量スペクトル

APCI 法による質量スペクトルは、試料霧化器温度とドリフト電圧により影響されることが知られている³⁾. そこで、反応イオンとなる光学活性なプロトン化 PEA の生成条件を検討した. Fig. 1 に PEA のプロトン化分子 (m/z 122) 及び脱アンモニアにより生成するフラグメントイオン (m/z 105) の生成量と試料霧化器温度とドリフト電圧の関係を示した. この結果、PEA の MH^+ を最も多く生成し、かつフラグメンテーションの少ない条件である 200° に霧化室温度を設定した. さらに付加イオン (m/z 288) と MAM のプロトン化分子 (m/z 167) を検出する条件を検討し、両方のイオンが観測できるよう、ドリフト電圧を 100 V に設定した. この条件下で観測される光学活性な MAM の質量スペクトルを Fig. 2 に示した. このスペクトルから、MAM のプロトン化分子 (m/z 167) の生成量が MAM の絶対配置により差が認められることがわかる (各フラグメントイオンの詳細な帰属は現在検討中).

本実験条件下での主な反応は Scheme 1 に示すように考えられる.

1) 移動相として大量に用いているメタノールとの気相競合反応で、PEA のプロトン化分子 $[\text{XH}]^+$ (m/z 122) が生成する.

2) $[\text{XH}]^+$ が反応イオンとなって分析試料である MAM をイオン化するが、その際にプロトンの移動を伴った電荷移動により生成する MAM のプロトン化分子 MH^+ (m/z 167) と、プロトン移動を伴わな

Fig. 1. Influence of vaporizer temperature and drift voltage on primary ion $[\text{XH}]^+$ (m/z 122).

Fig. 2. Typical APCI mass spectra of (*R*)- and (*S*)-MAM using [(*S*)-PEA + H] as reactant ion.

Scheme 1.

い反応イオンとのジアステレオメリックな付加イオン $[M+XH]^+$ (m/z 288) を生じる。

Fig. 3 に前述の条件下で、光学活性な MAM を 3 回連続分析した時の MH^+ のと $[M+XH]^+$ のマス chromatogram を示した。 $[MH]^+$ と $[M+XH]^+$ のピーク面積、特に $[M+XH]^+$ ($m/z=288$) イオンの生成量は、MAM のキラリティーが異なることによって変化することがわかる。Table 1 に MH^+ と $[M+XH]^+$ の生成量および生成比について、マス chromatogram から得られたものをまとめた。これらの結果から、ホモキラルな付加イオン ((S)-PEA·(S)-MAM もしくは (R)-PEA·(R)-MAM 型) がヘテロキラルな付加イオン ((S)-PEA·(R)-MAM もしくは (R)-PEA·(S)-MAM 型) よりも多く生成する傾向のあることが判明した。このことは、 $[XH]^+$ と MAM の間で生じるジアステレオメリックな 1:1 付加イオンの気相での会合形成が、立体構造の安定性に関与しているものと推察され、APCI-MS による不斉認識の可能性を示唆するものであると考えられる。

3.2 X 線結晶構造解析による検討

3.1 で観測された結果が不斉認識に由来するものかどうかを検討するため、X 線結晶構造解析を行っ

Fig. 3. Mass chromatograms of $[MH]^+$ (m/z 167) and $[M+XH]^+$ (m/z 288). Reactant ion: [(R)-PEA+H] (upper) and [(S)-PEA+H] (bottom).

Table 1. Relative abundances of characteristic ions in APCI mass spectra of (R)- and (S)-MAM, and (R)- and (S)-PEA.

X	M	Peak Area		Peak Ratio [M+HX] ⁺ /MH ⁺	mean (n=3)
		MH ⁺	[M+HX] ⁺		
(R)-PEA	(R)-MAM	28814	275062	8.28	8.50
		32822	277195	8.31	
		26723	238436	8.92	
	(S)-MAM	33756	201534	5.64	5.31
		41446	196785	4.75	
		35860	198336	5.53	
(S)-PEA	(R)-MAM	20723	77781	3.75	3.70
		21463	77685	3.62	
		20540	76309	3.72	
	(S)-MAM	17835	118405	6.64	7.11
		16263	125257	7.70	
		17046	119341	7.00

Fig. 4. Typical fractional crystal structures of (S)-PEA·(S)-MA (left) and (R)-PEA·(S)-MA (right) (dash line indicates the hydrogen bond).

た。X線結晶構造解析のモデル化合物は、ホモキラルな組み合わせとして (S)-PEA の (S)-MA(1:1) 塩、ヘテロキラルな組み合わせとして (R)-PEA の (S)-MA(1:1) 塩を用いた*¹。

Fig. 4 に両モデル化合物の結晶構造から、特徴的な差を示す部分を切り出して示した。

ホモキラル結晶の PEA の N 原子は、隣接する三つの COO⁻ と水素結合を形成しており、NH₃⁺ ...⁻OOC の無限鎖が結晶構造中に存在する。言い換えれば、ホモキラル結晶は完全な 1:1 の塩である。一方ヘテロキラル結晶では、N 原子と隣接した三つの COO⁻ との間で、二つの水素結合は存在するが一つが欠落している。このことは、ヘテロキラル結晶は見掛け上（分子数的に）は 1:1 であるが、塩構造としては欠陥を持つことを意味し、ホモキラル型結晶がヘテロキラル型結晶よりも安定であることを示唆している。この結果は、APCI-MS で観測された傾向と一致することから、モデル化合物として妥当であると考えられる。

* 両化合物の原子座標、結合距離・角度などのテーブルおよび Fo-Fc list は、supplemental data として事務局に提出した。

Fig. 5. Estimated structures of (S)-PEA·(S)-MAM (left) and (R)-PEA·(S)-MAM (right) diastereomeric adduct ions (m/z 288) optimized by MNDO-PM3.

Table 2. Summary of Both Estimated Diastereomeric Adduct Ions (m/z 288) by MNDO-PM3

	(S)-PEA·(S)-MAM	(R)-PEA·(S)-MAM
ΔH_f (kcal/mol)	41.2	43.4
Distances (Å)		
N ... O (=C)	2.71	2.73
N—H ... O (=C)	1.02 ($\angle$ 152.8°)	1.02 ($\angle$ 156.3°)
(N)—H ... O=C	1.76 ($\angle$ 127.3°)	1.76 ($\angle$ 126.7°)
N ... O (H)	3.13	3.11
Twisted angle(°)		
(N)H ... O=C—C (OH)	2.8	19.7

3.3 分子軌道法による検討

3.1 で観測された両付加イオンの熱力学的な安定性を評価するために、半経験的分子軌道法による検討を行った。半経験的分子軌道法は、水素結合などの弱い分子間相互作用に比較的精度が高いと評価されている、PM3 法を適用した。

3.2 で得られたそれぞれの結晶構造から、PEA·MA (1:1) の組み合わせを選び出し、MA を MAM に修飾して初期構造とした。組み合わせの選出には、水素結合の形成位置が MA の OH 基側の C=O にあるものを選んだ。この理由は、付加イオンがジアステレオメリックな強度差を生じるには、最低 2 個所で分子間相互作用を形成する必要がある、その一つは N 原子と C=O 基と考えられ、もう一つは N 原子と不斉炭素に結合する OH 基であると推察できるからである。

以上の条件を満たす組み合わせから、計算により最適化されたホモキラルおよびヘテロキラルの付加イオンの構造を Fig. 5 に示し、Table 2 に結果の一部を表にした。得られた両分子の生成熱から、ホモキラルな付加イオンがヘテロキラルな付加イオンよりも 2.2 kcal/mol 安定であるとの結果を得た。しかし、両付加イオンの安定性を決定付ける明確な違いは、軌道エネルギーの中からは見つけられなかった。最適化構造から考察すれば、両分子ともに N 原子と O(H) 原子のネットチャージ (いずれの分子とも N: +0.691, (H)O: -0.357 であった) と原子間距離から、両原子間に静電相互作用のあることが推察される。しかし N 原子と C=O 基は、両分子ともに水素結合を形成しているが、MAM の不斉炭素、カルボニル基および水素結合している水素からなるねじれ角 C—C=O ... H に差が認められる。この違いは立体化学的な効果に起因するものと考えられる。何故なら、水素結合に介在する水素原子は、C—C=O よ

りなる SP^2 平面と同じ平面上に存在するのが幾何学的に最も安定と考えられ¹²⁾, ホモキラル型付加イオンでは、ねじれ角が 2.8° でほぼ同平面内にあるが、ヘテロキラル型付加イオンでは、 19.7° とわずかに平面からずれていることによる。この結果は、水素結合力において、ホモキラル型付加イオンがヘテロキラル型付加イオンよりも強固であることを示唆しているものであると考えられる。

4. 結 論

APCI 質量分析法において、光学活性な 1-フェニルエチルアミンを試薬ガスとして用い、光学活性なマンデル酸メチルを測定するとき、ジアステレオメリックな付加イオンを生成し、その安定性は反応イオンと分析試料のキラリティーを反映したものとなり、スペクトル強度に影響する。この現象は、気相イオン状態での分子不斉認識反応と推察されるが、この不斉認識反応の裏付けするため、モデル化合物の X 線結晶構造解析を行い、それから推定される付加イオンの構造を半経験的分子軌道法で求めた。その結果、X 線構造解析、分子軌道法ともに APCI 質量分析法で得られた結果を支持するものであり、APCI 質量分析法を用いた不斉認識の可能性が示された。このことは、立体化学研究に有用な知見を与えると同時に、APCI 法が LC/MS のインターフェースとして優れた特徴をもつことと併せて考えると、今後の LC/MS の応用面に大きく貢献するものと考えられる。

文 献

- 1) (a) W. H. Pirkle and T. C. Pochapsky, *Chem. Rev.*, **89**, 347 (1989).
 (b) D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, **59**, 84A (1987).
 (c) W. Linder, *Chromatographia*, **24**, 97 (1987).
- 2) C. R. Blakley and M. L. Vestal, *Anal. Chem.*, **55**, 750 (1983).
- 3) M. Sakurai and H. Kanbara, *Anal. Chem.*, **60**, 774 (1988).
- 4) Y. Ito, T. Takeuchi, D. Ishii and M. Goto, *J. Chromatogr.*, **346**, 161 (1986).
- 5) C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, and J. B. Fern, *Anal. Chem.*, **57**, 675 (1985).
- 6) (a) K. Hashimoto, T. Inoue, Y. Sumida, S. Terada, and C. Watanabe "Advance in Mass Spectrometry," Vol. 11, P. Longevialle, ed., Hyden & Son, London, 1989, p. 606.
 (b) H. M. Fales and G. J. Wright, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 2339 (1977).
 (c) H. Suming, C. Yaozu, J. Longfei, and X. Shuman, *Org. Mass Spectrom.*, **21**, 7 (1986).
- 7) (a) G. Hofmeister and J. A. Leary, *Org. Mass Spectrom.*, **26**, 811 (1991).
 (b) M. Sawada, M. Shizuma, Y. Takai, H. Yamada, T. Kaneda, and T. Hanafusa, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4405 (1992).
- 8) K. Hashimoto, Y. Sumida, and S. Terada, Abstracts of Papers, 12th International Mass Spectrometry Conference (1991).
- 9) "International Tables for X-Ray Crystallography," Vol 4, Kynoch Press, Birmingham, 1974.
- 10) C. Giaccovazzo *et al.*, *Acta Cryst.*, **A38**, 663 (1982); *ibid.*, **A40**, 278(1984).
- 11) J. J. P. Stewart, MOPAC Ver. 6, *QCPE Bull.*, **9**, 10 (1989); Revised as Ver. 6.01 by T. Hirano, *JCPE Newsletter*, **1**, 10 (1989).
- 12) R. Taylor and O. Kennard, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5067 (1982).

Keywords

Chiral recognition

APCI-MS

Adduct ion

X-Ray crystallography

MNDO-PM3