

REGULAR PAPER

ESI および FAB マススペクトロメトリーを用いるアミン類およびジペプチド類のエナンチオマー過剰度の決定

Enantiomer Excess Determination of Amines and Dipeptides by ESI and FAB Mass Spectrometry Coupled with the Enantiomer-Labeled Host Method

澤田正實^{*a)}・亀井亮宏^{b)}・上野弘高^{c)}・山田 等^{a)}・高井嘉雄^{a)}
静間基博^{d)}・山岡寛史^{e)}・田中寿一^{c)}・荒川隆一^{b)}Masami SAWADA, Akihiro KAMEI, Hirotaka UENO, Hitoshi YAMADA, Yoshio TAKAI,
Motohiro SHIZUMA, Hiroshi YAMAOKA, Juichi TANAKA, and Ryuichi ARAKAWA

(Received March 31, 2004; Accepted June 1, 2004)

The enantiomeric excess (*e.e.*) determination of organic amines and dipeptides has been examined using ESI and FAB mass spectrometry. Here, an equimolar amount of labeled and unlabeled enantiomeric host pair compounds is mixed with a given *e.e.*-unknown guest compound. This is called the enantiomer labeled (EL)-host method. The enantiomeric host pairs employed were (1) chiral podands having galactose end-groups and (2) chiral crown ethers. Three sets of the I_e (intensity excess)-*e.e.* plot showed excellent linear relationships, indicating that the *e.e.*-value of *e.e.*-unknown amine compounds can be determined by the simple ESIMS or FABMS coupled with the EL-host method, within the mean error of 1.5–4%*e.e.*

1. はじめに

マススペクトロメトリーによるエナンチオマー過剰度 (*e.e.*) の決定は、近年分析化学/有機化学/バイオ化学の分野で大いなる注目を浴びている^{1), 2)}。そのわけは、従来の HPLC 法や NMR 法に比べて、微量必要量、高感度、迅速決定が期待されるゆえである。ごく最近、Cooks³⁾らは ESIMS/MS 法を用いる kinetic 法に基づいて、アミノ酸やアミン

類の精度よい *e.e.* 値決定法を報告している^{3)~5)}。Lebrilla⁶⁾らは ESIFTMS 法を用いてゲスト交換反応に基づいて *e.e.* 値決定の可能なことを報告している⁶⁾。

われわれは以前 FABMS 法で安定的に検出するエナンチオ選択的ホスト-ゲストコンプレックスイオンに着目した⁷⁾。そして、ホストのエナンチオマーの一方を重水素同位体標識した擬ラセミホスト対を用いて (EL (Enantiomer Labeled)-ホスト法と呼んでいる)、ホスト-ゲストコンプレックスイオンのピーク強度比から、*e.e.* 未知のアミンゲスト (塩) の *e.e.* 値が FABMS 法で容易に決定できることを示してきた^{1), 8)~12)}。

本論文では上記と同様の EL-ホスト法に基づいて、ESIMS (シングル MS) 測定によって *e.e.* 値が決定できることを取扱う。ESIMS 法で検出されるエナンチオ選択的ホスト-ゲストコンプレックスイオンのピーク強度比は、疎水性基が多いと、圧縮される場合のあることがすでに報告されている^{1), 13)}。そこで、ここでは圧縮度の少ないホスト-ゲストの組合せシステムを選んだ。Chart 1 に示した非環状系ホスト対 A (DD-1 と LL-1-*d*₄) あるいは環状系ホスト対 B を用いて、主としてゲスト 3 (PglyOMe⁺Cl⁻) の ESIMS 法による *e.e.* 値決定について述べる。次いでホスト対 C (ホスト対 B と重水素標識位置が異なる) を用いてゲスト 4 (Ala-Ala⁺; ジペプチド塩酸塩) の FABMS 法による *e.e.* 値決定についても併せて述べる。

*a) 大阪大学産業科学研究所材料解析センター (☎567-0047 茨木市美穂ヶ丘 8-1)

Materials Analysis Center, The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University (8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan)

b) 関西大学工学部応用化学科 (〒564-8680 吹田市山手町 3-3-35)

Department of Applied Chemistry, Kansai University (Suita, Osaka 564-8680, Japan)

c) 大阪工業大学応用化学科 (☎535-0002 大阪市旭区大宮 5-16-1)

Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology (16-1 Omiya 5-chome, Asahiku, Osaka 535-0002, Japan)

d) 大阪市立工業研究所工業化学課 (☎536-8553 大阪市城東区森の宮 1-6-50)

Osaka Municipal Technical Research Institute (1-6-50 Morinomiya, Joto-ku, Osaka 536-8553, Japan)

e) 大阪女子大学理学部環境理学科 (☎590-0035 堺市大仙町 2-1)

Department of Environmental Sciences, Faculty of Science, Osaka Women's University (2-1 Daisen-cho, Sakai, Osaka 590-0035, Japan)

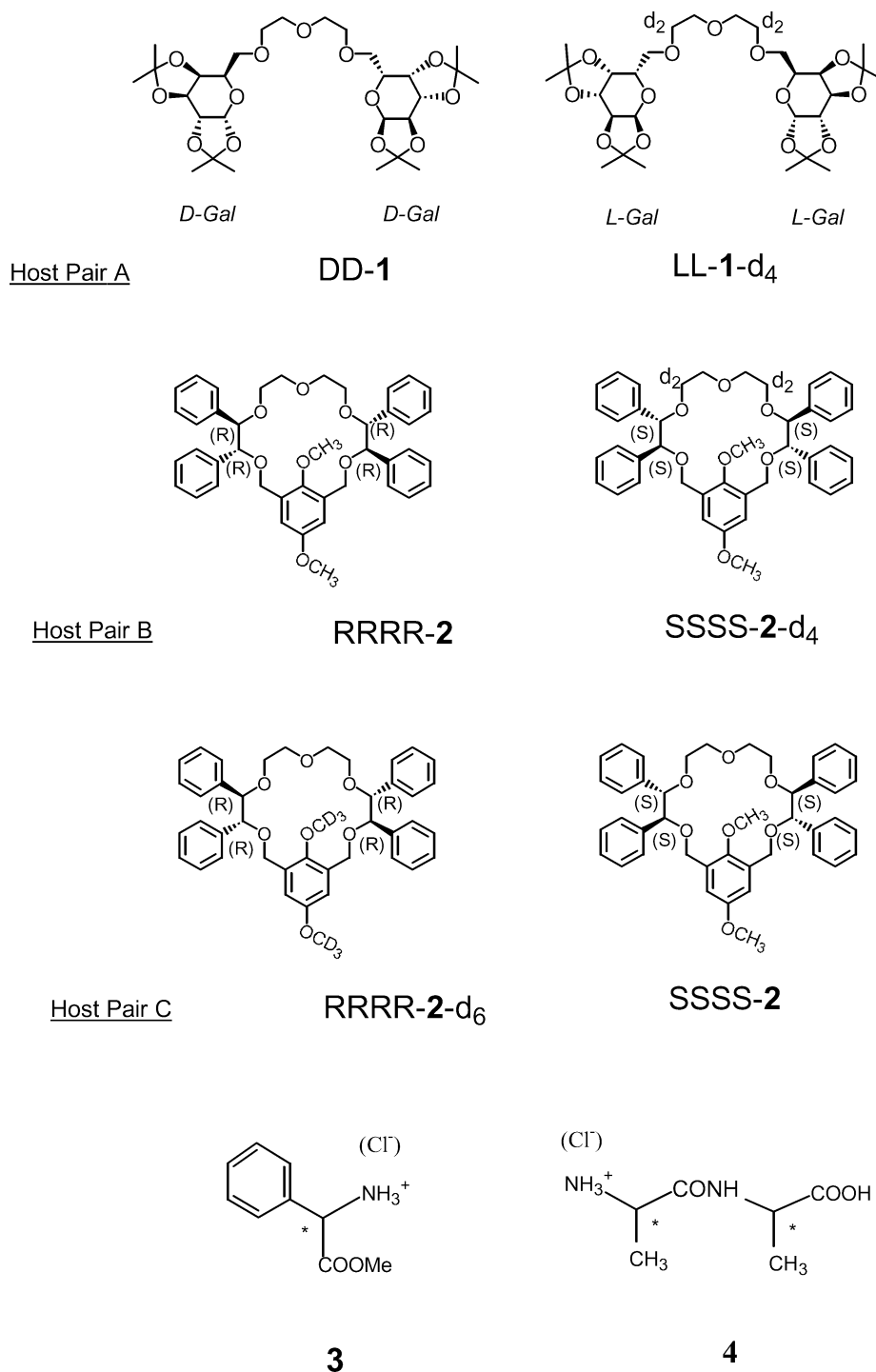


Chart 1. Structures of the hosts and guests employed.

2. 方 法

EL-ホスト法では標識体と非標識体のエナンチオマーホストの等モル混合物を *e.e.* 値未知のゲストとコンプレックスさせ (Chart 2), ESI マススペクトル測定を行う。 n マス離れて出現するホスト-ゲストコンプレックスイオンのピーク強度比, I_R/I_{S-d_n} あるいは I_{R-d_n}/I_S (重水素標識位置が異なっている), を IRIS と略称する。この IRIS 値を用いて式 (1) で算出される I_e 値 (Intensity excess 値) と *e.e.*

値とが (0, 0) 点を通る直線関係にあることはすでに証明されている¹¹⁾。

$$I_e = (IRIS - 1) / (IRIS + 1) \quad (1)$$

したがって、本論文では ESI や FAB マススペクトロメトリーで実験的に得られた I_e 値と両エナンチオマーを混合して調製されたゲストサンプルの *e.e.* 値との直線関係の実際の成立精度を検討することにした。

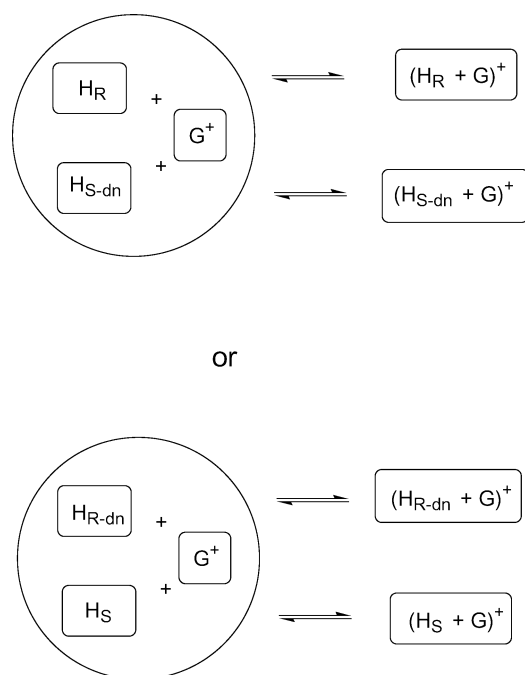


Chart 2. An outline of the EL-host method.

3. 実 験

3.1 試料

〈ホスト対 A〉

非環状系ホスト DD-1 はすでに合成、報告済のサンプルを用いた¹⁴⁾。そのエナンチオマーの LL-1-*d*₄ は対応する diethylene glycol-*d*₄-di-*p*-toluenesulfonate を用いて、同様に¹⁴⁾合成した。シリカゲル液体クロマトグラフィー（酢酸エチル-*n*-ヘキサン=1:1）で精製して用いた（無色、シロップ）。

〈ホスト対 B, およびホスト対 C〉

環状系ホスト RRRR-2-*d*₆, SSSS-2 および RRRR-2, SSSS-2-*d*₄ はすでに合成、報告済みのサンプルを用いた¹¹⁾。

〈ゲスト〉

Phenylglycine methyl ester hydrochloride 3 の R- および S-エナンチオマーは市販品（Aldrich 社製）を再結晶して使用した。ジペプチド Alanyl-alanine 4 の DD- および LL-エナンチオマーは、市販品（Sigma 社製, Fluka 社製）をそれぞれそのまま使用した（それぞれ RR-, SS-エナンチオマーに対応する）。

〈その他の薬品〉

MeOH, CHCl₃ は DOTITE スペクトロゾール（Dojindo 社製）を使用した。

3.2 試料の調製と ESI マススペクトル

ESI マススペクトロメーターには LCQ-DECA XP Plus（サーモクエスト(株)）を標準の状態で使用した（正イオンモード、スプレー電圧 5.0 kV, キャピラリー温度 175°C, 流速 20 μL/min（ホスト対 A のとき）あるいは 10 μL/min（ホスト対 B のとき）, 積算 50 回）。

代表的な ESIMS/EL-ホスト法の試料調整は、ホスト対

A 使用の場合、以下のものであった。ホスト DD-1 5.9 mg を 500 μL のクロロホルムに、ホスト LL-1-*d*₄ 6.0 mg を 500 μL のクロロホルムに溶解させた（濃度はそれぞれ 20 mM）。その二つの溶液からそれぞれ 50 μL ずつ取り出して、メタノールを加えてトータル 50 mL にした（溶液 a: 濃度はそれぞれ 20 μM）。

次にキラルゲスト R-3 4.0 mg, S-3 4.0 mg をそれぞれ 10 mL のメタノールに溶解させた（2 mM）。この溶液 2 種を用いてトータル 1000 μL になるように混合した。つまり、R:S の体積比が、したがって濃度比が (1) 10:0, (2) 9.5:0.5, (3) 7.5:2.5, (4) 5:5, (5) 2.5:7.5, (6) 0.5:9.5, (7) 0:10 になるようにした 7 種の溶液を作製した。それぞれが (1) R 100%*e.e.*, (2) R 90%*e.e.*, (3) R 50%*e.e.*, (4) 0%*e.e.*, (5) S 50%*e.e.*, (6) S 90%*e.e.*, (7) S 100%*e.e.* のゲスト 3 の溶液となる（2 mM）。これを 100 倍希釈して使用した（溶液 b: 濃度は 7 種共 20 μM）。溶液 a 50 μL, 溶液 b 50 μL, メタノール 900 μL を混合して測定用最終溶液を作製した（成分濃度は [HR]=[HS-*d*_n]=[G]=1 μM）。

同様にアキラルゲストとしてグリシメチルエステル塩酸塩 (GlyOMe⁺Cl⁻) 2.5 mg を 1 mL のメタノールに溶解させ（20 mM）、その溶液を 1000 倍希釈した（溶液 c: 濃度は 20 μM）。これをホスト濃度の 1:1 確認用に用いた (IRIS=0.99)。

3.3 試料調製と FAB マススペクトル

FAB マススペクトロメーターには JEOL JMS M600 を標準の状態で使用した（加速電圧 3 kV, 高速中性原子 Xe, FAB イオン銃電圧 6 kV, エミッション電流 1.0 mA, イオン源真空度約 2×10⁻⁶ Torr, スキャン速度 5S (*m/z* 20~2300), 積算 40 回）。

ホスト対 C の場合の FABMS 用試料調製は既報の方法に従った^{11), 15)}。イオン源内で溶媒が蒸発した後の NBA マトリックス中での各成分の濃度は、[HR-*d*₆]=[HS]=[G]=0.016 M であった。中性の Ala-Ala 4 は 0.5 M の HCl MeOH 溶液（和光純薬工業(株)製）を等モル量加えて、塩酸塩の MeOH 溶液として（カチオン化し）、使用した。ホスト対 C の濃度 1:1 の確認のためにはアキラルゲスト GlyOMe⁺Cl⁻ を用いた (IRIS=1.00)。

4. 結果と考察

非標識体 DD-1 ホストと標識体 LL-1-*d*₄ ホストの 1:1 等モル混合物（ホスト対 A）を作り、これと種々の %*e.e.* 値に調製したアミン塩ゲスト 3 との組合せにより ESI スペクトルを測定した（MeOH 中）。*m/z* 756 と *m/z* 760 の一組のホスト-ゲストコンプレックスイオン（それぞれ (H_{DD}+G)⁺ および (H_{LL-*d*₄}+G)⁺ に対応する）が明確、かつ安定的に出現した。ホストの NH₄⁺ 付加イオン (*m/z* 608, 612), ホストの Na⁺ 付加イオン (*m/z* 613, 617) や K⁺ 付加イオン (*m/z* 629, 633) も出現した。代表的な ESI スペクトルを Fig. 1, Fig. 2 に掲げ、得られた IRIS 値を Table 1 に整理した。ホスト-ゲストコンプレックスイオンピーク間隔はここでは 4 マス単位離れているので (Chart 2 の

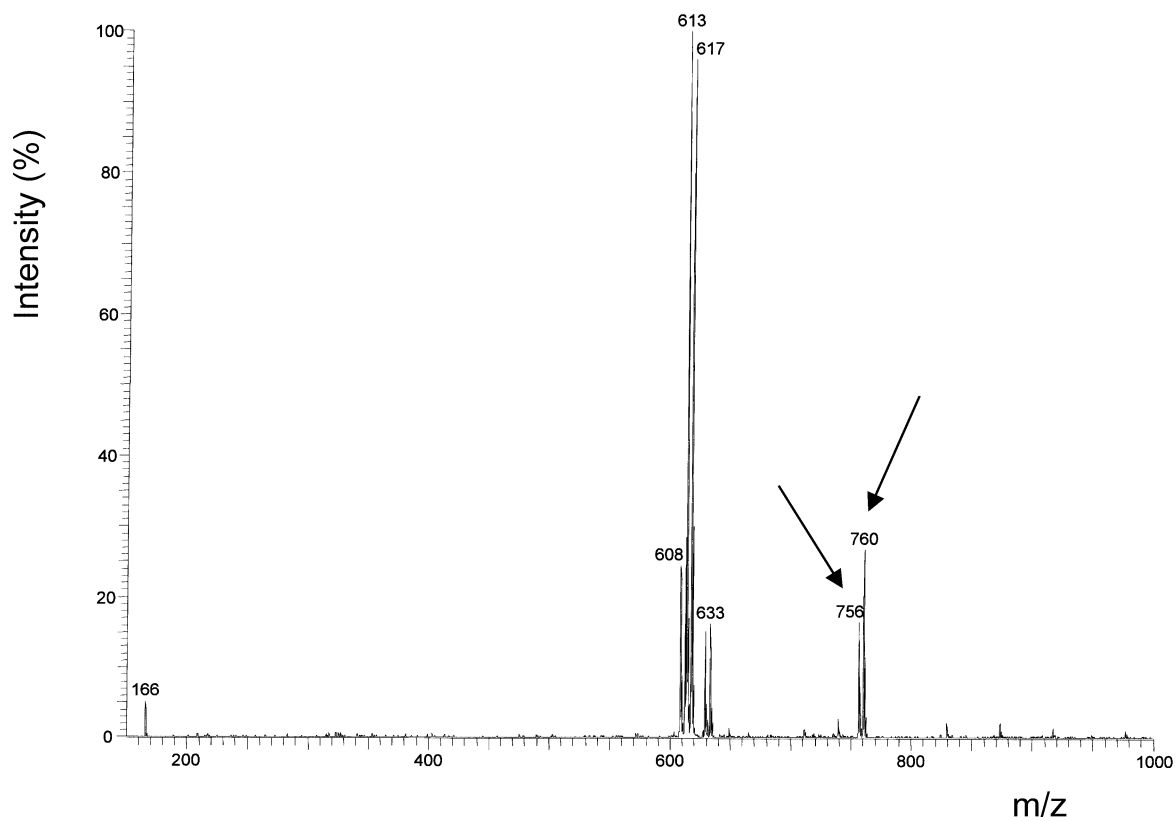


Fig. 1. An ESI mass spectrum for the EL-host method between host pair A (1 : 1 mixture of DD-1 and LL-1- d_4) and guest **3** of R 100%*e.e.* The peaks of m/z 756 and m/z 760 correspond to the complex ion peaks of $(\text{DD-1}+\mathbf{3})^+$ and $(\text{LL-1-}d_4+\mathbf{3})^+$, respectively (IRIS=0.65).

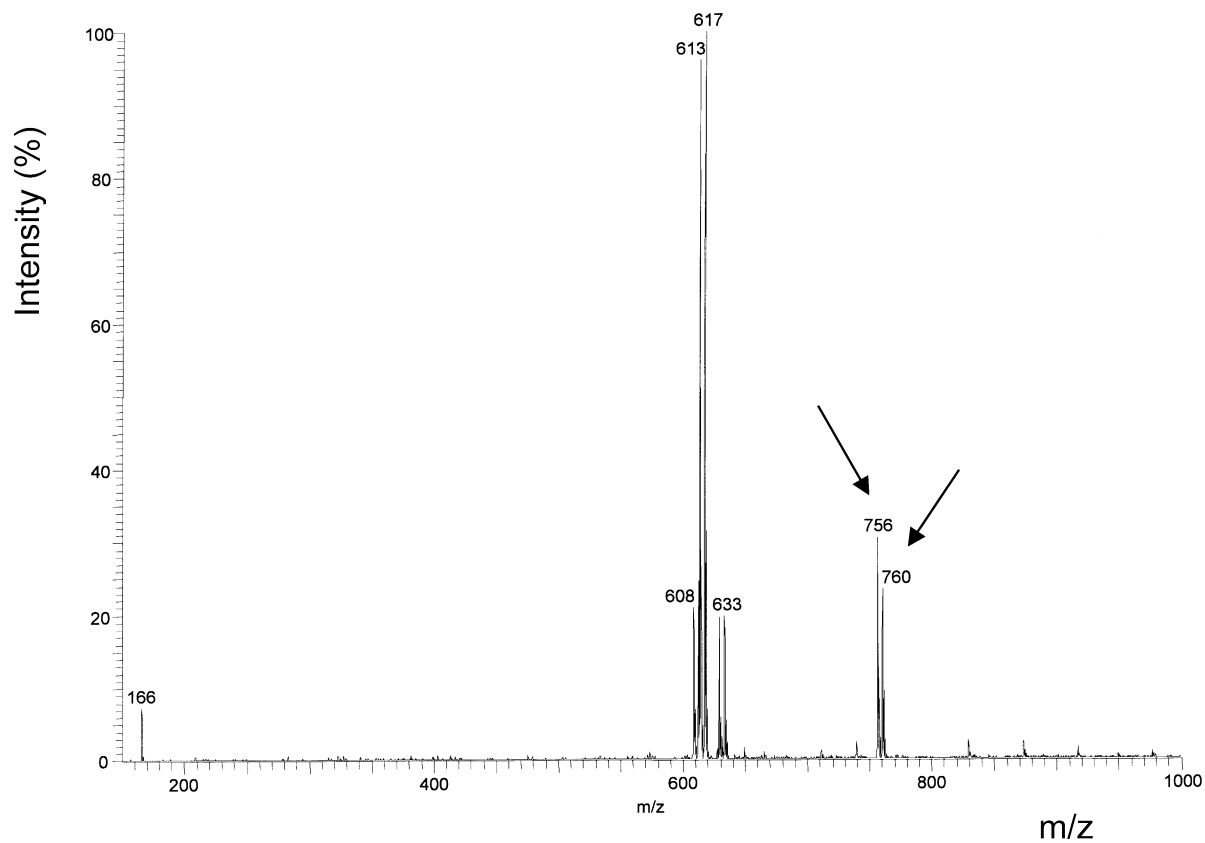


Fig. 2. An ESI mass spectrum for the EL-host method between host pair A (1 : 1 mixture of DD-1 and LL-1- d_4) and guest **3** of S 100%*e.e.* The peaks of m/z 756 and m/z 760 correspond to the complex ion peaks of $(\text{DD-1}+\mathbf{3})^+$ and $(\text{LL-1-}d_4+\mathbf{3})^+$, respectively (IRIS=1.52).

Table 1. IRIS Values and ESI Mass Spectrometrically Obtained *e.e.* Values Using the ESIMS/EL-Host Method (Host Pair A and Guest 3)

| Prepared % <i>e.e.</i> | IRIS | $I_e^{a)}$ | Obtained % <i>e.e.</i> | Error |
|------------------------|--------------------|------------|------------------------|-------|
| R 100 | 0.65 ^{b)} | -0.212 | 106.1 | 6.1 |
| R 90 | 0.71 | -0.170 | 84.8 | 5.2 |
| R 50 | 0.83 | -0.093 | 46.4 | 3.6 |
| 0 | 0.99 | -0.005 | 2.5 | 2.5 |
| S 50 | 1.24 | -0.107 | 53.6 | 3.6 |
| S 90 | 1.46 | 0.187 | 93.5 | 3.5 |
| S 100 | 1.52 ^{b)} | 0.206 | 103.2 | 3.2 |
| Mean ave. | | | | 4.0 |

^{a)} Obtained using Eq. (1).

^{b)} A quantitative cross chiral relationship held satisfactorily ($0.65 \times 1.52 = 0.99$).

$n=4$), 天然同位体補正は行わなかった. IRIS 値は *e.e.* 値の変化を反映して, 0.65~1.52 と順次変化した. さらに, ゲスト 3 R 100%*e.e.* のときの IRIS=0.65 とゲスト 3 S 100%*e.e.* のときの IRIS=1.52 との積は 0.99 ($0.65 \times 1.52 = 0.99$) と得られ, クロスキラリ相関¹⁾ (=1.00) は定量的に成立することがわかった. (1) 式で得られた I_e 値と調製 *e.e.* 値との直線関係を Fig. 3 に掲げた. 原点の (0, 0) 点を通ると規定して取扱った直線関係は勾配 -0.00204 と得られ, 相関係数 $R^2=0.9976$ の優れた直線性を示すことがわかった. この直線関係を利用して, 実験的に得られた I_e 値から算出した *e.e.* 値は Table 1 に示したとおりであり, その平均誤差は 4.0%*e.e.* であった.

同様に, 非標識体 RRRR-2 ホストと標識体 SSSS-2- d_4 ホストの 1:1 等モル混合物 (ホスト対 B) と種々に調製した %*e.e.* 値のアミン塩ゲスト 3 との組合せにより, ESIMS/EL-ホスト法 (MeOH 中) の成立精度を調べた. その結果, I_e 値と *e.e.* 値との直線関係は, 勾配 0.00132, 相関係数 $R^2=0.9967$ が得られ, 平均誤差は 4.0%*e.e.* であった.

一方, FABMS を用いて EL-ホスト法 (NBA マトリックス中) の成立精度を調べた. 標識体 RRRR-2- d_6 ホストと非標識体 SSSS-2 ホストとの 1:1 等モル混合物 (ホスト対

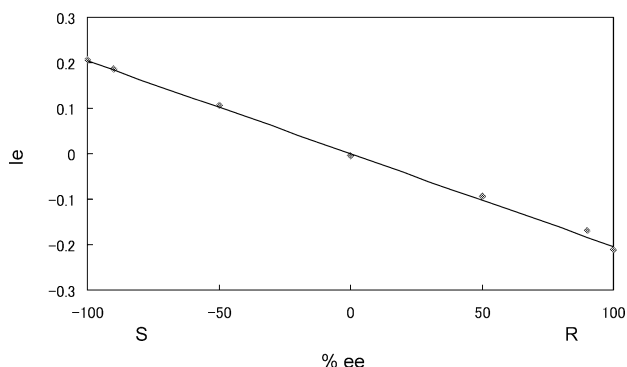


Fig. 3. An I_e -*e.e.* plot for the complexation between host pair A and guest 3 of various sets of %*e.e.* using ESI mass spectrometry (slope = -0.00204 , $R^2=0.9976$).

Table 2. IRIS Values and FAB Mass Spectrometrically Obtained *e.e.* Values Using the FABMS/EL-Host Method (Host Pair C and Guest 4)

| Prepared % <i>e.e.</i> | IRIS | $I_e^{a)}$ | Obtained % <i>e.e.</i> | Error |
|------------------------|--------------------|------------|------------------------|-------|
| R 100 | 1.61 ^{b)} | 0.230 | 100.2 | 0.2 |
| R 90 | 1.51 | 0.207 | 88.2 | 1.8 |
| R 50 | 1.26 | 0.115 | 50.0 | 0.0 |
| 0 | 1.00 | 0.000 | 0.0 | 0.0 |
| S 90 | 0.67 | -0.207 | 85.5 | 4.5 |
| S 100 | 0.62 ^{b)} | -0.230 | 102.0 | 2.0 |
| Mean ave. | | | | 1.4 |

^{a)} Obtained using Eq. (1).

^{b)} A quantitative cross chiral relationship held satisfactorily ($1.61 \times 0.62 = 1.00$).

C) と種々に調製した %*e.e.* 値の Ala-Ala 塩酸塩 (ゲスト 4) を組み合わせた. 着目している m/z 821 と m/z 827 の 1 組のホスト-ゲストコンプレックスイオン (それぞれ $(H_{SS}+G)^+$ および $(H_{RR}-d_6+G)^+$ に対応する) が出現した. 代表的なスペクトルを Fig. 4 に掲げる. 得られた IRIS 値の変化を Table 2 に示した. ここで, 帰属のできていない m/z 819 の M+2 同位体ピークが m/z 821 ピークに重なるので, コントロール実験で得られた補正係数 0.325 を用いて補正した数値を IRIS 値として使用した. I_e -*e.e.* プロットは原点を通る勾配 0.00230 の直線が得られ, 相関係数 $R^2=0.9995$ の優れた直線関係を示した (Fig. 5). この関係を利用して FABMS より実験的に得られた I_e 値から算出した *e.e.* 値 (Table 2) の平均誤差は 1.4%*e.e.* であった.

以上述べてきたように, EL-ホスト法を用いてマスペクトロメトリーで得られる I_e 値は *e.e.* 値と優れた直線関係を示すことが実証された. したがって, 例えば (i) 100%*e.e.* の R-あるいは S-エナンチオマーのいずれかが入手できれば, $I_{e(100)}$ 値を測定し, (ii) 次いで, *e.e.* 値未知の (エナンチオマー混合物の) サンプルの I_e 値を測定し,

$$\%e.e. = 100 \times I_e / I_{e(100)} \quad (2)$$

(2) 式より %*e.e.* 値を決定できることを意味する. ここで示した実験結果は濃度などの最適実験条件を求めて実行したわけでもなく, 調製 %*e.e.* 値を他の分析法 (例えば HPLC 法など) で確認したわけでもない. したがって, 例えば平均値を採用するなどして種々改良を加えれば, %*e.e.* 決定の精度をまだまだ上げることは可能である. ここで用いた環状系ホストや非環状系ホストとアミン塩類 (厳密にはアンモニウムイオン類) とのホスト-ゲストコンプレックスイオンは非常に安定的に出現する. ESIMS の場合は FABMS の場合に比べて, (1) 使用する溶液濃度が 1000 倍以上薄いこと, (2) ホスト-ゲストの組合せによりキラリ認識能力が若干圧縮されて観測される場合があり, $|I_{e(100)}|$ 値が小さくなり, したがって勾配が小さくなること, などのため, 決定される *e.e.* 値の誤差は前者では 4%*e.e.* 以内, 後者では 1.5%*e.e.* 以内であった. $|I_{e(100)}|$ 値のより大きい, つまりキラリ認識能力のより大きいホスト-ゲス

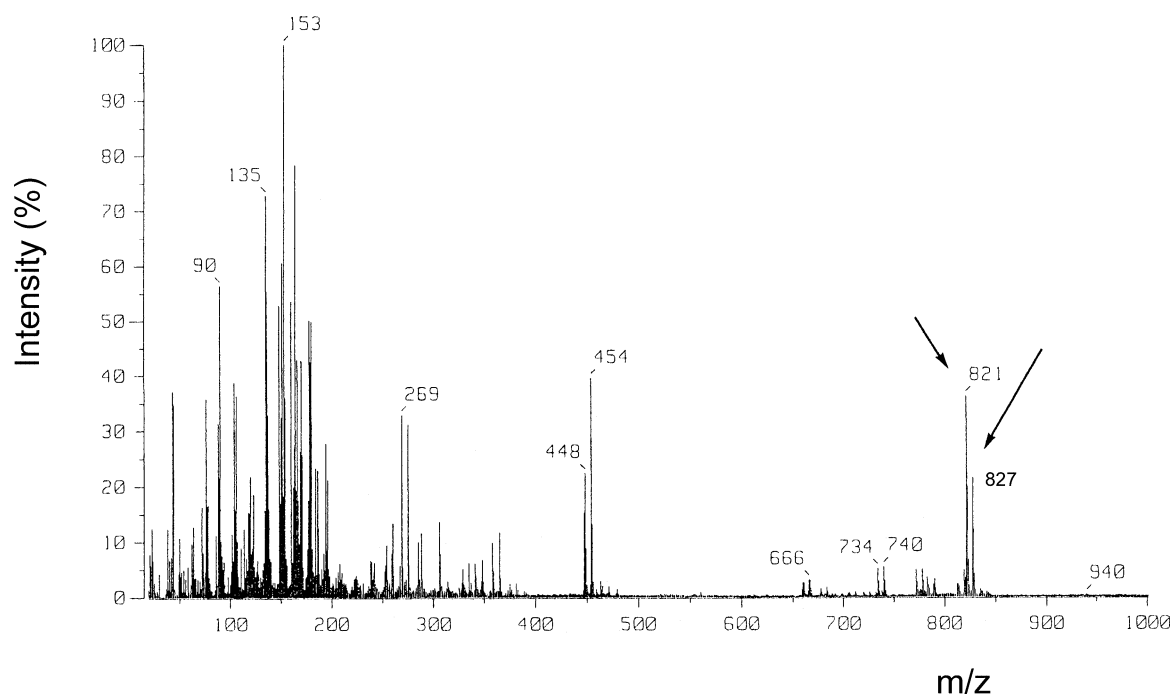


Fig. 4. A FAB mass spectrum for the EL-host method between host pair C (1/1 mixture of RRRR-2- d_6 and SSSS-2) and guest 4 of SS 100%*e.e.* The peaks of m/z 827 and m/z 821 correspond to the complex ion peaks of (RRRR-2- d_6 +4) $^+$ and (SSSS-2+4) $^+$, respectively (IRIS=0.62).

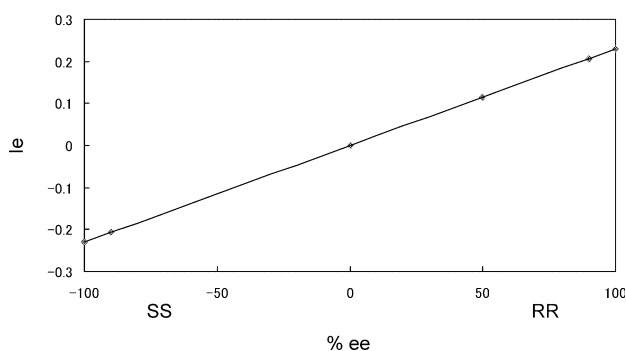


Fig. 5. An I_e -*e.e.* plot for the complexation between host pair C and guest 4 of various sets of %*e.e.* using FAB mass spectrometry (slope=0.00230, $R^2=0.9995$).

トの組合せであれば、*e.e.* 値の精度をより高めることは可能である。

文 献

- 1) M. Sawada, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **48**, 231 (2000).
- 2) M. Sawada, "The Encyclopedia of Mass Spectrometry," Vol. 4, ed. by N. M. M. Nibbering, Elsevier (2004), Part H 06, in press.
- 3) W. A. Tao, D. Zhang, E. N. Nikolaev, and R. G. Cooks, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 10598 (2000).
- 4) L. Wu, E. C. Meuer, and R. G. Cooks, *Anal. Chem.*, **76**, 663 (2004).
- 5) X. Zheng, R. G. Cooks, R. Augusti, and W. A. Tao, "The Encyclopedia of Mass Spectrometry," Vol. 1, ed. by P. B.

Armentrout, Elsevier (2003), Chapter 5, p. 350.

- 6) G. Grigorean and C. B. Lebrilla, *Anal. Chem.*, **73**, 1684 (2001).
- 7) M. Sawada, M. Shizuma, Y. Takai, H. Yamada, T. Kaneda, and T. Hanafusa, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4405 (1992).
- 8) M. Sawada, H. Yamaoka, Y. Takai, Y. Kawai, H. Yamada, T. Azuma, T. Fujioka, and J. Tanaka, *Chem. Commun.*, 1569 (1998).
- 9) M. Sawada, H. Yamaoka, Y. Takai, Y. Kawai, H. Yamada, T. Azuma, T. Fujioka, and J. Tanaka, *Int. J. Mass Spectrom.*, **193**, 123 (1999), (Molecular Recognition Special Issue).
- 10) M. Shizuma, H. Imamura, Y. Takai, H. Yamada, T. Takeda, S. Takahashi, and M. Sawada, *Chem. Lett.*, 1292 (2000).
- 11) M. Sawada, Y. Takai, H. Imamura, H. Yamada, S. Takahashi, H. Yamaoka, K. Hirose, Y. Tobe, and J. Tanaka, *Eur. J. Mass Spectrom.*, **7**, 447 (2001).
- 12) M. Shizuma, H. Imamura, Y. Takai, H. Yamada, T. Takeda, S. Takahashi, and M. Sawada, *Int. J. Mass Spectrom.*, **210/211**, 585 (2001).
- 13) M. Sawada, Y. Takai, H. Yamada, M. Yoshikawa, R. Arakawa, H. Tabuchi, M. Takada, J. Tanaka, M. Shizuma, H. Yamaoka, K. Hirose, K. Fukuda, and Y. Tobe, *Eur. J. Mass Spectrom.*, **10**, 27 (2004).
- 14) M. Shizuma, Y. Kadoya, Y. Takai, H. Imamura, H. Yamada, T. Takeda, R. Arakawa, S. Takahashi, and M. Sawada, *J. Org. Chem.*, **67**, 4795 (2002).
- 15) M. Sawada, T. Nishiwaki, H. Yamaoka, H. Yamada, Y. Takai, and R. Arakawa, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **48**, 231 (2000).

Keywords: Chiral recognition, ESIMS, FABMS, Chiral amine, Host-guest complexation, Deuterium labeling.