

MALDI TOF-MSによる 有機合成の反応追跡と生成物確認

三木 卓幸¹, 田中 海成¹
¹東京工業大学

ユーザーベネフィット

- ◆ 短時間で簡便に、機器トラブルの心配が少なく質量分析が行えます。
- ◆ 同位体ピークが明瞭でBrやCl等の有無が簡単に判断できます。

■ はじめに

有機合成において、生成物の特定や反応の進行状況を把握することは極めて重要です。具体的には「反応溶液中に、どんな割合で、どのような化合物が存在しているのか」を知る必要があります。

最も簡便かつ汎用的に反応追跡する方法として、薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography: TLC) が挙げられます。これは固定相のシリカ表面への吸着しやすさが、試料に含まれる化合物間で異なることを利用して分離する方法です。しかし、このような方法では化合物の極性の違いに基づき分離するため、類似する構造の化合物を明瞭に分離することはできません。

上記の問題を解決するため、本稿では短時間で簡便に測定できるMALDI TOF-MSを用いた、半定量的な反応追跡及び生成物の確認の有効性をご紹介します。

■ ハロゲン化ベンジルの置換方法

ベンジルハライドは蛋白質を化学修飾する際に頻繁に用いられる求電子反応基¹⁾です。システイン残基の側鎖である求核性の高いチオール基と選択的に反応します。そのため、蛍光色素や薬剤等をベンジルハライドと連結することで、蛋白質へ部位特異的に導入できます。また、ハロゲンの種類によって反応性も異なり、塩化ベンジルは臭化ベンジルやヨウ化ベンジルと比べて反応性が低いことが特徴です。

蛋白質との反応にはこれらの反応基を使い分ける必要があります。汎用的に用いるには反応性の異なるこれらの修飾剤を合成する必要があります。

ここでは、塩化ベンジルを2つ有する化合物を原料とし、臭化リチウム (LiBr) を用いて双方を臭化ベンジルに置換する反応を行いました。

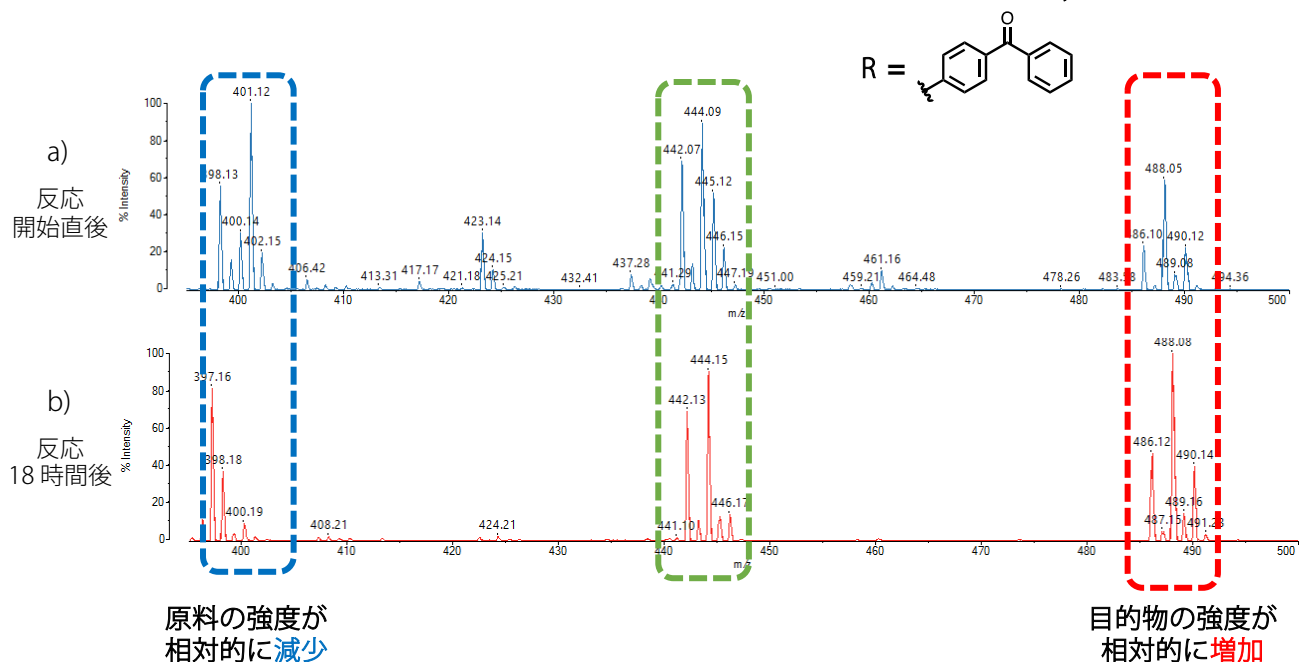
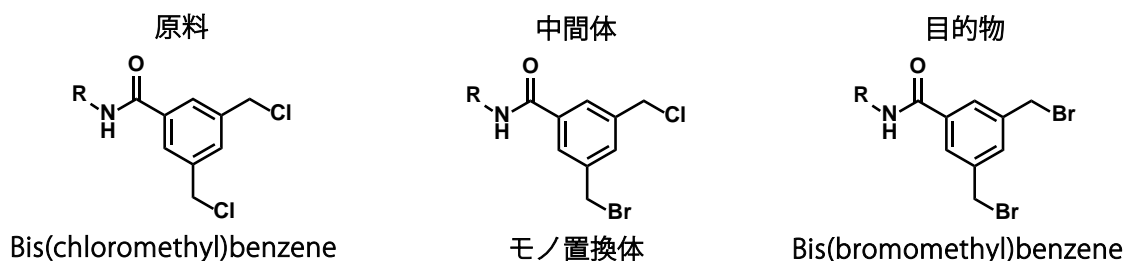


図 1 MALDI-8020 を用いた反応追跡および生成物の質量分析結果

■ サンプル調製と測定

反応中の溶液を1 μ l程度サンプリングし、ガラスチューブに入れます。乾燥後、 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) 溶液 (0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA)、水/アセトニトリル溶液) に溶解させ、MALDI用分析プレートに載せます。完全に乾くまで静置します。

また、TLCで展開した後にサンプル調製することも可能です。その場合には反応液をTLCに滴下し、クロロホルム/メタノール混合液で展開した後に、UV吸収のあるスポットを削り取ります。削り取ったシリカから化合物をメタノールで抽出し、その上澄みを用いて同様の方法でCHCA溶液と混合しプレートに載せます。

サンプルを十分に乾燥させた後、MALDI-8020 にプレートを挿入し、測定を行います。

■ 反応追跡の質量分析結果

質量分析の結果より、反応開始直後 (図1a) では観察された原料 (Bis(chloromethyl)benzene) が、反応開始18 時間後 (図1b) には強度が減少し、同時に目的物である Bis(bromomethyl)benzeneの強度が増加していることがわかります。この後、さらに反応を続け、生成物を回収した結果が図3になります。

Brには、主に2 つの同位体 (^{79}Br と ^{81}Br) が存在し、その存在比はほぼ1 : 1になります。そのため、2 つBrをもつ化合物は、Brの同位体のみを考えると1 : 2 : 1の割合で、 m/z が2 ずつ離れたピークが観察されます (表1・図2)。

表1 目的物の同位体ピークの理論質量と実測値

理論質量 (m/z)	実測値 (m/z)
485.97 (51.3%)	485.97
487.97 (100.0%)	488.03
489.97 (49.0%)	490.04

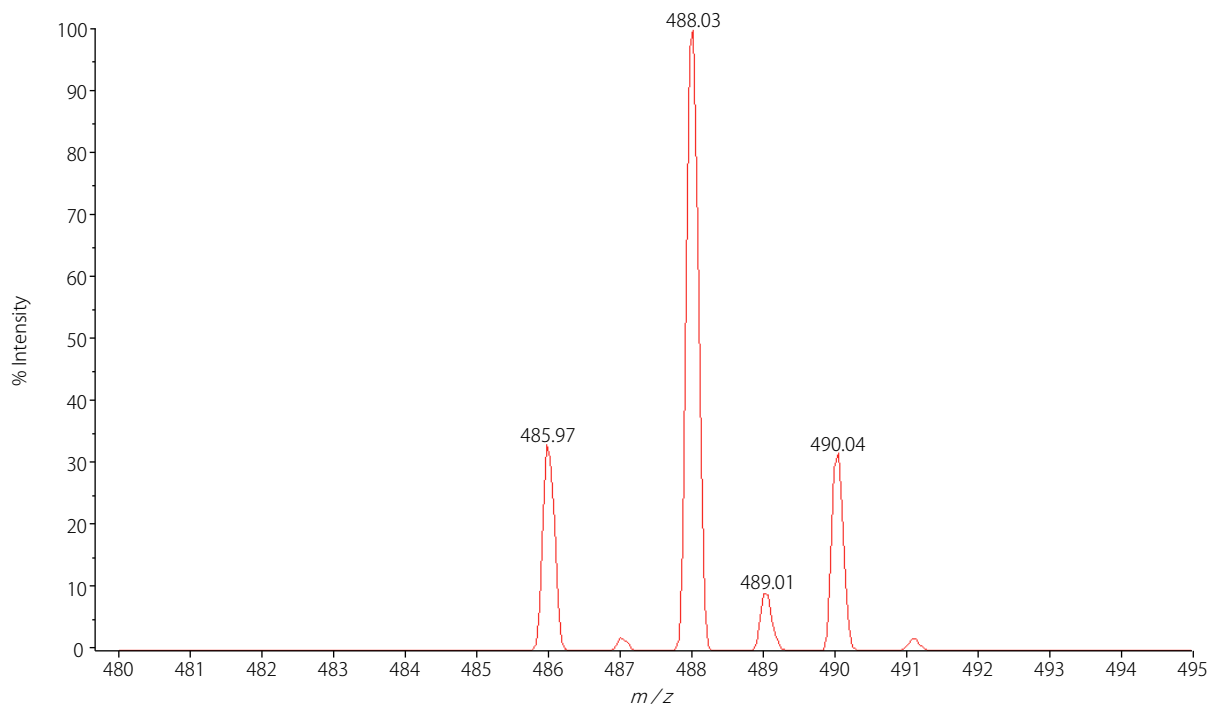


図3 回収した生成物の質量分析結果
臭化化合物に典型的な同位体ピークが認められます。

図3 のピークを見ると、臭化化合物に特徴的な同位体ピークパターンが観測され、この点からも目的物がBrを2 つ有する化合物であることが判断できます。

■ まとめ

MALDI-8020 を用いて、原料と中間体であるモノ置換体、目的物であるBis(bromomethyl)benzeneの反応追跡並びに生成物の確認を行いました。今回の分析のように、TLCによる分離が困難な化合物に対してもMALDI-8020 を用いて測定を行うことで、BrやCl等の有無を簡単に判断することができます。

また、MALDI-8020 を用いた測定では、“LCMSやGCMSのような分離系がなく、乾燥した固相状態での測定となるため、真空系のメンテナンスリスクが低い” という理由で共用設備として導入しやすいという特長もあります。このように、機器トラブルの心配が少なく簡単に測定が行えるという点からも、MALDI-8020 の有用性が示されます。

■ 参考文献

- 1) Heinis, C., Rutherford, T., Freund, S. & Winter, G. Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 502-507(2009).

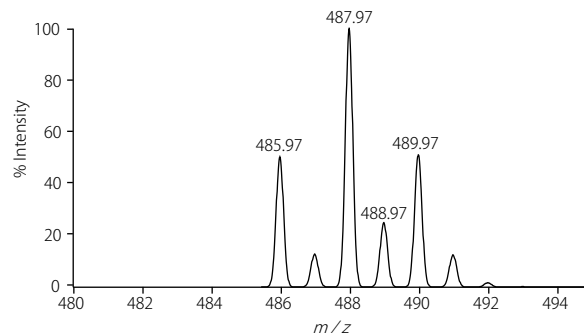


図2 目的物の理論同位体ピーク