Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

ダイレクトMSを用いた有機合成反応のモニタリング

アプリケーションの利点

ダイレクトMSは、反応試験やサンプル調整をせずに1分以内で、構造情報を得て、その結果を迅速に報告することができます。結果として、有機合成の作業効率を高め、時間の節約や分析コストの削減につながります。

ウォーターズのソリューション

ダイレクトMS（ASAP-MS）

ACQUITY® TQD

PoraPak Rxn CX カートリッジ

キーワード

有機合成、揮発性および半揮発性、イオン源技術、還元アミノ酸、アミド形成反応、固相抽出割合

はじめに

投資に対するリターンを最大限にするために化学業界は、生産性を向上させながら市場へ新製品を投入するように挑戦しています。多くの場合、収益のわずかな増加と新製品や新しいプロセスを開発することで、企業の利益が大幅な増加に転じる場合があります。　新しい化学物質の開発や有機合成の効率を向上させるには、反応経過と反応生成物の精製過程のタイムリーな分析データーが必要となります。

有機合成研究では、薄層イオンクロマトグラフィー（TLC）を用いて、合成反応のモニタが頻繁に行われ、化学構造情報を提供し、移動相の最適化が必要となります。NMR、LC、LC/MSのような従来の分析法は、沈殿析出、抽出、ろ過、分離そして気化のような時間のかかる手順を必要するため、構造情報のデーターを得るのに時間を要する場合があります。新しい反応や化合物を分析するとき、分析法開発や専門家によるデーター解析が必要なります。それゆえに、迅速に構造情報を得ることができる技術が望まれています。

ウォーターズの大気圧固体分析プローブ（ASAP）は、質量分析計におけるイオン化法の一つで、揮発性/半揮発性の物質を幅広くイオン化する有効な技術です。このイオン化法は、大気圧化学イオン化（APCI）に類似しています。この技術は、脱溶媒ガスでサンプルを気化させ、コロナ放電を用いてイオン化をします。図1に示すような固体あるいは液体サンプルは、ASAPを用いて質量分析計に直接挿入します。

図1：
サンプルをプローブの先端に直接付着させ、そのプローブをイオン源に挿入し、データーを取得。

このアプリケーションノートは、原材料を調べるためにタンデム四重極型質量分析計（TQD）とASAPを組み合わせることで、還元アミノ酸やアミド形成の反応過程、固相抽出の分子構造の識別を実証します。反応試験やサンプル調整をせずに1分以内で、構造情報を得て、その結果を迅速に報告することが可能になり、結果として、有機合成研究の作業効率を高め、時間の節約や分析コストの削減につながります。

イオン源内のフラグメンテーションや熱分解を避けるために、低いコーン電圧（2V）と脱溶媒温度（400℃）を印加しました。ラジカルカチオン（M^+）の形成を最小限に抑えるために、水を満たした2mlバイアルをイオンチャンバーの中に配置することで再現性のある質量スペクトルを得ることができました。

実験

還元アミノ酸反応（反応式1）

メタノール3.5ml入りのガラスバイアルにアセトフェノン（0.218g,1.8mmol）とアニリン（0.169g,1.8mmol）を加え、さらにメタノール中1.5N 塩酸を1.2ml加えました。その混合物を室温で2分間攪拌し、メタノール中11.3mg/ml(1.8mmol)シアノ水酸化ホウ素　ナトリウム($NaBH_3CN$)溶液を10ml加え、反応を開始させました。ASAPとTQDを組み合わせて反応過程の確認を行いました。

アセチルイミダゾールによるアシル化反応（反応式2）

1つ目のバイアルでは、アセチルイミダゾール（416mg,1.8mmol）をアセトニトリル5mlで溶解させ、2つ目のバイアルでは、フェニルフェニルアミン（170mg,1mmol）をアセトニトリル5mlで溶解させました。その2溶液を混合させた反応過程はASAPとTQDの組み合わせで測定行いました。

無水酢酸によるアシル化反応（反応式3）

4-ジメチルアミノピリジン（0.257mg,2.1mmol）とメチルオキシベンジルアミン（258mg,2.1mmol）を10mlのアセトニトリルで溶解させ、室温で1分間攪拌させました。

過剰に無水酢酸（320mg、3.1mmol）を加えることで、アシル化反応を開始させました。

反応完了後、混合物8mlをWaters 20ml PoraPak Rxn CX カートリッジに装填しました。その生成物は、10mlのメタノールともに溶出しました。そして、塩基触媒（4-ジメチルアミノピリジン）は、20mlの5%水酸化アンモニウムとともに溶出しました。

ダイレクトMS分析条件

ASAPとTQDを組み合わせた分析手順を図1に示します。

最初に、ASAPプローブの先端のガラス棒に反応混合物を浸し、サンプルを付着させました。

その後、サンプルを付着させたASAPプローブをMSイオン源に挿入し、脱溶媒ガスの温度を400℃に設定し、分析を行いました。60～500Daの質量範囲のMSフルスキャンデーターは、以下のMS設定条件を用いて、0.2秒スキャンを使用して30秒で結果を得ることができました。

イオン化モード：	ESCi　ポジティブ
コロナ電流（APcI）：	5μA
コーン電圧：	2V
エクストラクター：	1V
脱溶媒温度：	400℃
イオン源温度：	120℃
脱溶媒ガス流量：	500L/時間
コーンガス：	0L/時間
コリジョンガス流量：	0.1ml/分

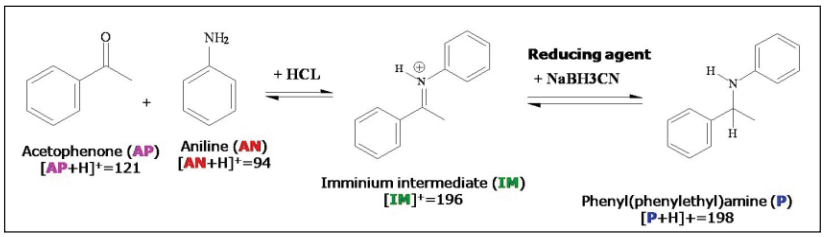
MSの設定条件

イオン化モード：	ESCi　ポジティブ
コロナ電流（APcI）：	5μA
コーン電圧：	2V
エクストラクター：	1V
脱溶媒温度：	400℃
イオン源温度：	120℃
脱溶媒ガス流量：	500L/時間
コーンガス：	0L/時間
コリジョンガス流量：	0.1ml/分

各分析の前に新しいガラス棒をイオン源に挿入し、おおよそ15秒間ガラス棒の焼き出しを行い、そして、バックグラウンドのリファレンススキャンを取得しました。その後、プローブをイオン源から抜き、サンプルを付着させ、プローブを再挿入してデーターを取得し、最終的にサンプルのTICからリファレンススキャンのベースラインを引いた質量スペクトルを得ました。

結果と考察

還元アミノ酸反応は、農薬、食品添加物、薬そして建築用ブロックのような高性能材料を製造するために、何段階もの有機合成が用いられています。フェニル（フェニルエチル）アミン(反応式1)を合成する還元アミノ酸反応は、ボーチらによって報告された同条件で行いました。反応混合物は、ESIキャピラリーチューブやLCカラムに影響を及ぼす還元剤から$NaBH_3CN$を除去する工程なしにLCやLC/MSで分析することができませんでした。そこでASAP-MSを用いると、この反応混合物は還元剤を除去せずに直接プローブに付着させ、分析を行うことができます。



反応式1：フェニル（フェニルエチル）アミンを作るための還元アミノ酸反応

図2には、フルスキャン質量スペクトルを反応順に示しました。図2aでは、メタノールにアセトフェノン（AP）とアニリン（AN）の混合液を加えた後に得られ、プロトン化アニリンイオン（m/z 94）、プロトン化アセトフェノンイオン（m/z 121）、アニリンとアセトフェノンの付加イオン（m/z 124）、アセトフェノンの二量体イオン（m/z 241）の4イオンピークが観測されました。それらの同一性は、MS/MSを用いて確認されました。図2bでは、塩酸溶液を加えてから2分後、m/z 196に鉛丹中間体4（IMM）の生成が質量スペクトルとして現れました。図2cでは、還元剤($NaBH_3CN$)を加えてから10分後、プロトン化フェニル（フェニルエチル）アミンイオン（m/z 198）の生成の質量スペクトルが現れ、鉛丹中間体が消失しました。図2dでは、40分後には、生成物の相対イオン強度の増加と反応イオンの減少を示しました。図2eでは、最終的に4時間後の質量スペクトルでは、残りの反応は見られませんでした。

ASAP-TQDを用いると、反応混合物中のターゲットイオンのスペクトルが、フルスキャンモードで検出されたイオンと同一であることを簡単に確認することができました。図3で示すように7Vのコリジョン電圧でm/z 198のプロダクトイオンスペクトルを測定し、m/z 94とm/z 105の2つのプロダクトイオンピークが観測されました。m/z 198は、フェニル（フェニルエチル）アミンイオンがプロトン化したものと判明しました。

この実験では、反応試験やサンプル前処理をせず、有機合成効率や生成率を最大限にするために、ASAP-MSによる還元アミノ酸の反応過程の構造情報を迅速に提供できることを証明しました。

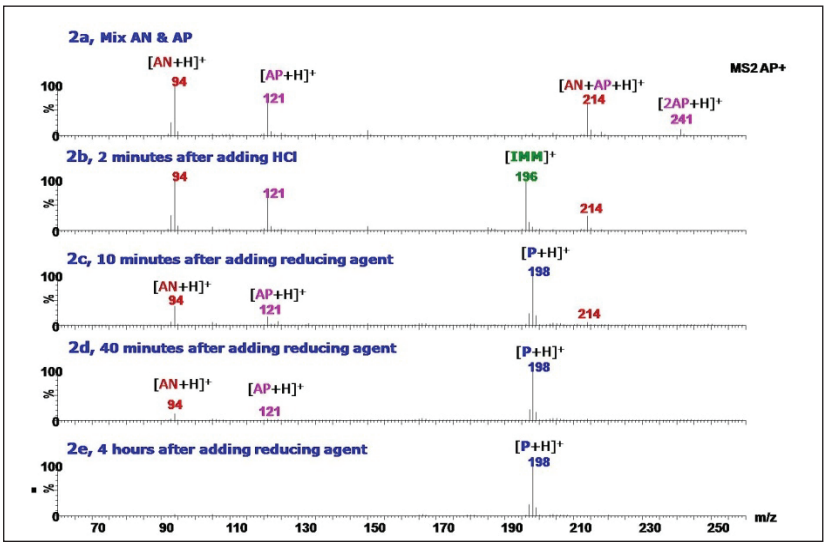


図2：

ASAPフルスキャン質量スペクトルは、還元アミノ酸を測定したものです。

2a;メタノールにアセトフェノン（AP）とアニリン（AN）の混合液を加えた後に得られた。

2b;塩酸（HCl）溶液を加えた2分後に得られた。

2c;シアノ水酸化ホウ素ナトリウム($NaBH_3CN$)溶液を加えた10分後に得られた。

2d;シアノ水酸化ホウ素ナトリウム($NaBH_3CN$)溶液を加えた40分後に得られた。

2e;シアノ水酸化ホウ素ナトリウム($NaBH_3CN$)溶液を加えた4時間後に得られた。

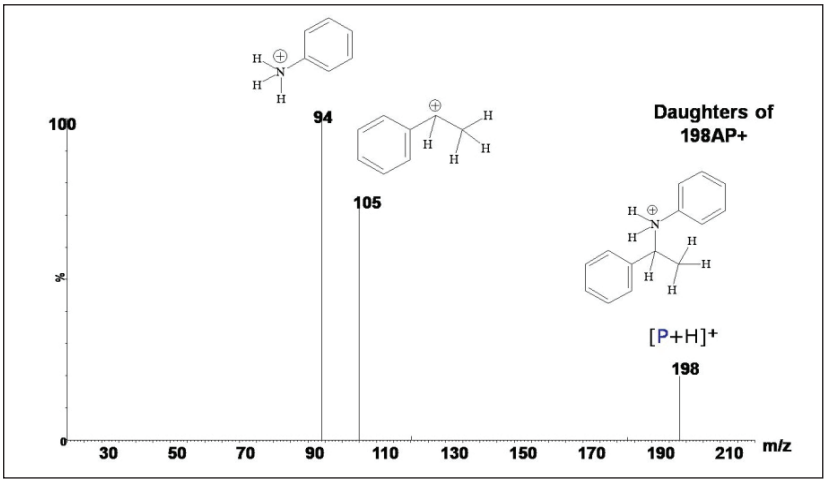


図3：

プロダクトイオンスペクトルはm/z 198：ターゲットとされた合成反応生成物であるフェニル（フェニルエチル）アミン（P）の構造確認

アシル化反応によるアミド結合の生成は、多くの産業でとても重要な合成経路の一つとなります。アシル化反応は、反応中で用いられるアミン、アシル化試薬および触媒への依存度が高くなります。作業手順は、通常、液-液抽出や気化を含んでいます。その生成物は、フラッシュクロマトグラフィーまたは分取クロマトグラフィーを用いて精製されます。

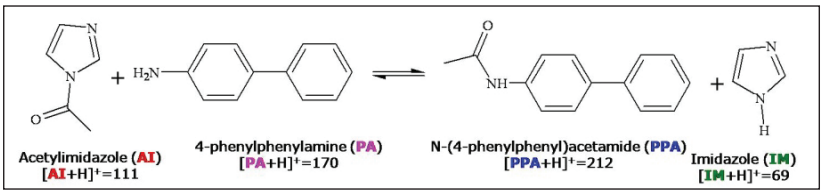
反応式2は、4-（フェニルフェニル）-アセトアミド（PPA）を生成するために、アシル化試薬としてアセチルイミダゾール（AI）を用いたアセトアミド生成の例です。

図4に示すようにASAPとTQDを用いてアシル化反応を観測しました。

図4aでは、アセトニトリルにアセチルイミダゾール（Al）を溶解させた後に得られ、アセチルイミダゾールの分子イオンと二量体イオンは、それぞれm/z 111とm/z 221に観測されました。イミダゾールイオン（m/z 137、m/z 69）の測定では、いくつかが分解したことを示しています。これは、大気中の湿気へ暴露によりイミダゾールからアセチルイミダゾールに加水分解することがあるため、この分解は予測できるものです。

図4bでは、アセトニトリルにフェニルフェニルアミン（PA）を溶解させた後に得られ、4-フェニルフェニルアミン（m/z 170）のプロトン化イオンと4-フェニルフェニルアミン（m/z 339）の二量体イオンを観測しました。

図4cでは、PAとAl溶媒を混合させた10分後に得られ、4つの新しいイオン（m/z 212,280,381,423）が観測されました。この実験は、図4cの中でラベルされた構造と一致していました。アセチルイミダゾールと4-フェニルフェニルアミンの溶媒を混合させてから3時間後(図4d)のAI/IM付加体（m/z 179）は、検出されませんでした。そして、3日後（図4e）には限定した物質（PA）は存在しませんでした。



反応式2
4-（フェニルフェニル）アセトアミドを作るためのアセチルイミダゾールによりアシル化反応

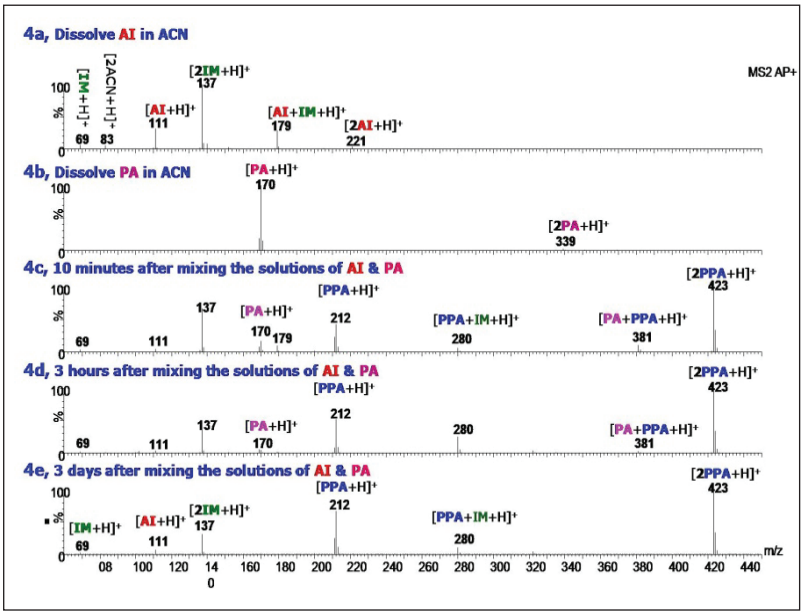
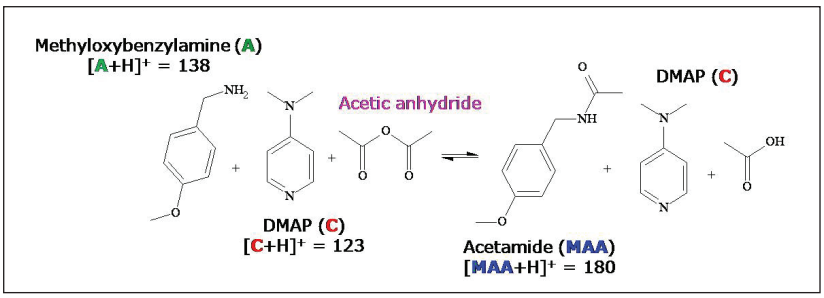


図4：
ASAPのフルスキャン質量スペクトルは、アシル化を測定したものです。
4a;アセトニトリル（ACN）にアセチルイミダゾール（AI）を溶解させた後に得られた。
4b; アセトニトリル（ACN）にフェニルフェニルアミン（PA）を溶解させた後に得られた。
4c;AIとPAの溶液を混合させた10分後に得られた。
4d;AIとPAの溶液を混合させた 3時間後に得られた。
4e; AIとPAの溶液を混合させた 3日後に得られた。

反応式3では、アシル化試薬として無水酢酸を用いて、N-[(メトキシフェニル)メチル]アセトアミド（MMA）を生成するための塩基触媒として4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）を使用してアセトアミド組成反応の別例を示しました。



反応式3

N-[(メトキシフェニル)メチル]アセトアミド（MMA）を作るための無水酢酸によるアシル化反応

図5では、フルスキャン質量スペクトルの反応順とアシル化反応分離法を示しました。

図5aは、メチルオキシベンジルアミンとCH_3CNで塩基触媒DMAPを混合させた後に得られました。原材料と触媒の主な4イオンピークは、図5で示すように判明しました。

プロトン化N-[(メトキシフェニル)メチル]アセトアミドイオン（m/z 180）とその二量体（m/z 359）の生成からなるイオンは、はっきりと現れ（図5b）、そして、反応物ピークは、消失しました。結果、反応が5分で終わったことを示唆しました。

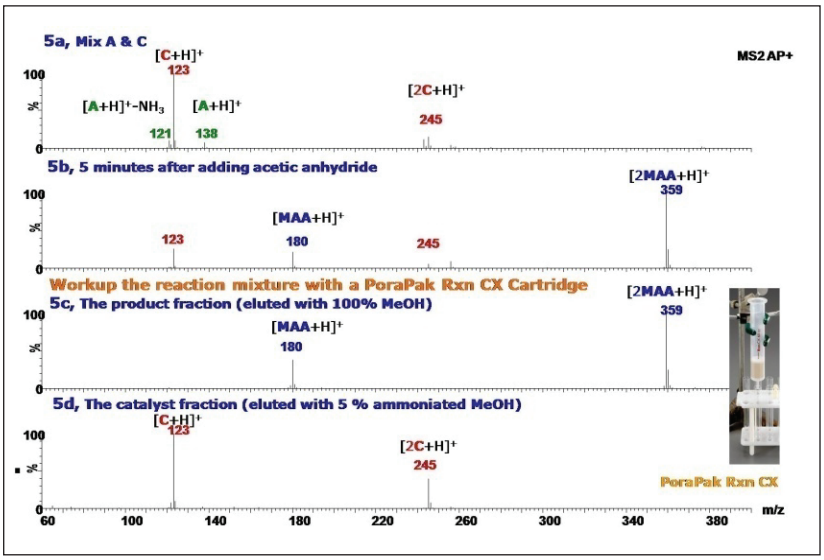


図5：

ASAPのフルスキャン質量スペクトルは、無水酢酸によるアシル化反応を測定したものです。

5a; メチルオキシベンジルアミン（A）とアセトニトリルで塩基触媒DMAP（C）を混合させた後で得られた。

5b; 無水酢酸を加えた5分後に得られた。

5c; その生成物の割合は、PoraPak Rxn CX カートリッジから100%メタノールとともに溶出された。

5d; 割合は、5%水酸化アンモニウムを含んだメタノールとともに溶出された。

反応混合物をDMAP触媒からN-[(4-メトキシフェニル)メチル]アセトアミド(MAA)の生成物を分離するために、PoraPak Rxn CX カートリッジで精製しました。PoraPak Rxn CX カートリッジは、従来の工程手順を行わず、中性および塩基化合物向けに設計された強陽イオン交換充填剤を含んでいます。反応混合物は、20ml PoraPak Rxn CX カートリッジへ最初に装填しました。そのときの100%メタノールは、MAA生成の溶出で使用しました。

図5cでは、メタノールに溶出されたプロトン化N-[(4-メトキシフェニル) メチル]アセトアミドイオン (m/z 180) とその二量体イオン (m/z 359) が観測されました。トラップした塩基化合物は、5%水酸化アンモニウムを含むメタノール溶液を用いて、カートリッジから溶出されました。5dで示すようにプロトン化したDMAPイオン (m/z 123) と二量体イオン (m/z 245) だけが観測されました。このデーターは、反応生成物MAAがPoraPak Rxn CX カートリッジを用いたことでDMAPからきれいに分離したことを証明しました。

この方法では、ASAPとTQDを組み合わせてMSやMS/MSのデーターをもたらしました。

このシステムは、反応、反応生成物の情報確認、固相抽出からの生成物の割合の確認、そして構造決定の為のプロダクトイオンスペクトルを得る反応過程の確認を迅速に行うことが可能です。混合物の迅速分析のための代替オプションとして、使いやすさと低コストを提供するダイレクトMS (ASAP-MS:大気圧固体分析プローブ及びシングル四重極質量分析計) があります。網羅的な試料の差異は、Xevo G2 Tofの高感度なコリジョン TOF型質量分析計により、フルスペクトル解析、精密質量データー、そしてフラグメントから構造解析を行うことが可能です。反応混合物の複雑さへの依存や試験の必要条件によって、それぞれのシステムを選択することができます。

結論

このアプリケーションノートでは有機合成研究におけるASAP-MSの利点を証明しました。

反応試験や分離を必要としないASAP-MSは、反応混合物を直接分析することが可能になり、1分以内で質量スペクトルを得ることができました。

- 原材料の主成分を識別
- 反応過程を観測
- 反応生成物の組成を確認
- 生成物の相対存在量を比較
- 反応試験とフラッシュクロマトグラフィー分離中の生成割合を識別

このように有機合成の作業効率を高めることで、迅速に情報を報告することが可能です。

そして、ダイレクトMS（ASAP-MS）は、溶媒の使用量を減らすことで、環境への影響を配慮し『グリーンケミスト』を実現させ、結果的に日々のラボコストを削減することができます。

参考文献

1. C N McEwen et al. Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments. Anal Chem. 77, 23: 7826-7831. 2005.
2. C Petucci et al. Atmospheric solids analysis probe: a rapid ionization technique for small molecule drugs. J Mass Spectrom. 43, 11: 1565-1568, 2008.
3. M Twohig et al. Rapid detection and identification of counterfeit of adulterated products of synthetic phosphodiesterase type-5 inhibitors with an atmospheric solids analysis probe. Drug Testing and Analysis. 2, 2: 45-50, 2010.
4. R F Borch et al. The Cyanohydridoborate Anion as a Selective Reducing Agent. J Amer Chem Soc. 93: 2897, 1971.

適用規格:JISQ9001:2008(ISO9001:2008)
登録番号:JMAQA-331 登録日:1999年05月31日
審査登録範囲:理科学機器(液体クロマトグラフ・質量分析装置・データ管理システム等)の輸入・販売から保守業務までのトータルサポート及び保守プランの設計・開発

このISO9001認証登録ロゴは、Waters Corporationのものです。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters、ACQUITY、Xevo は Waters Corporationの登録商標です。PoraPak および The Science of What's Possibleは Waters Corporationの商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2012 Waters Corporation. Produced in Japan. 2012年3月 720003628JA PDF