

報 文

トリメチルシリル誘導体の高速原子衝撃質量分析法
及びタンデム質量分析法への応用木下 武^{®*}, 鳥居香代子*, 石川 富雄*,
丸山 康子*, 高沢 智子*, 小坂 俊幸*Application of trimethylsilyl derivatives of biologically related compounds
to fast atom bombardment mass spectrometry and tandem mass spectrometryTakeshi KINOSHITA, Kayoko TORII, Tomio ISHIKAWA,
Yasuko MARUYAMA, Tomoko TAKAZAWA and Toshiyuki KOSAKA** Analytical and Metabolic Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd., 1-2-58,
Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo 140

(Received 31 January 1996, Accepted 11 March 1996)

The effect of trimethylsilyl (TMS) derivatives, which have been long and widely used especially in gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), was examined with fast atom bombardment (FAB) mass spectrometry. In order to investigate what kind of information can be obtained from FABMS of TMS derivatives of biologically related compounds, FABMS and FAB MS/MS (tandem mass spectrometry) of TMS derivatives of compounds such as 2'-O-methyladenosine, 3'-O-methyladenosine, guanosine, uridine and some amino acids were studied. As a result, FABMS spectra of trimethylsilylated compounds gave molecular ion peaks showing that the TMS groups attached to alcoholic hydroxy groups remained intact, while the TMS groups attached to NH, SH, COOH and amide groups were labile and partly removed. It was concluded that FABMS spectra of trimethylsilylated substances have the advantage of not only determining the total number of active hydrogens, but also differentiating groups such as OH, NH, SH, CONH and COOH. It was also proved that FAB mass spectrometry of TMS derivatives of biologically related compounds are very useful for structural analysis of the native compounds. Here we have mainly used 3-nitrobenzyl alcohol (3-NBA) as the matrix for FABMS because of its solubility in the trimethylsilylation reaction mixture.

Keywords : trimethylsilyl derivatives of biologically related compounds; FABMS; MS/MS; reduction phenomenon in FABMS.

1 緒 言

極性化合物のトリメチルシリル (TMS) 誘導体化法

* 三共(株)分析代謝研究所: 140 東京都品川区広町
1-2-58

は GC/MS 測定用に広く用いられてきており、複雑な生体構成成分、薬物代謝物、天然の生理活性物質等々の構造解析や定量分析において大きな成果を挙げてきている^{1)~3)}。

一般に、TMS 化剤は OH, NH, SH 及び COOH の

ような活性水素を比較的緩和な条件の下で TMS 化し、熱安定性の良い揮発性誘導体にすることができるが、TMS 誘導体は一般に比較的加水分解を受けやすいため、難揮発性の極性溶媒をマトリックスとして使用する高速原子衝撃質量分析 (FABMS)^{4)~6)}用の試料としては不適当と考えられており、ほとんどその応用はなされておらず、わずかに二、三の文献が見られるのみである^{7)~9)}。

Schram らはアデノシン及びそのモノホスフェートの TMS 誘導体の FABMS 測定を行い、その有用性を示唆し⁷⁾、その後二、三の核酸関連化合物に応用し、感度的にフリー体の FABMS と比較して 10~100 倍の感度の上昇が見られることを見いだしている⁸⁾。又、McCloskey らは、アミノ酸を含むヌクレオシドの解析に TMS 誘導体の FAB タンデム質量分析 (MS/MS) 法を応用した例を報告している⁹⁾。しかし、いずれの報告にも詳しい考察はなされていない。そこで、著者らは構造解析を行う上での新たな構造情報を得る目的で、種々の生体関連化合物の TMS 誘導体の分析に FABMS 法及び

FABMS/MS 法¹⁰⁾¹¹⁾の応用を試みた。その結果、未知化合物の構造解析をする上で役立つ、幾つかの有用な知見を得たので報告する。

2 実 験

2・1 試薬及び試料の調製

試薬及び溶媒は、いずれも市販品 (特級) をそのまま用いた。TMS 誘導体化はアセトニトリル (20 μ l) に試料 (0.1 mg) を溶解して、ピリジン (2 μ l) とシリル化剤の *N,O*-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド (BSA) ないしは *N,O*-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド (BSTFA) (20 μ l) を加えて、60°C で 10 分間反応後、その一部 (1 μ l) を FAB 用マトリックスの 3-ニトロベンジルアルコール (3-NBA) (1 μ l) に FAB-MS 用のターゲット上で混合し、そのまま FABMS 測定に供した。

2・2 装置及び測定条件

測定には日本電子製 JMS-HX100 タンデム型質量分

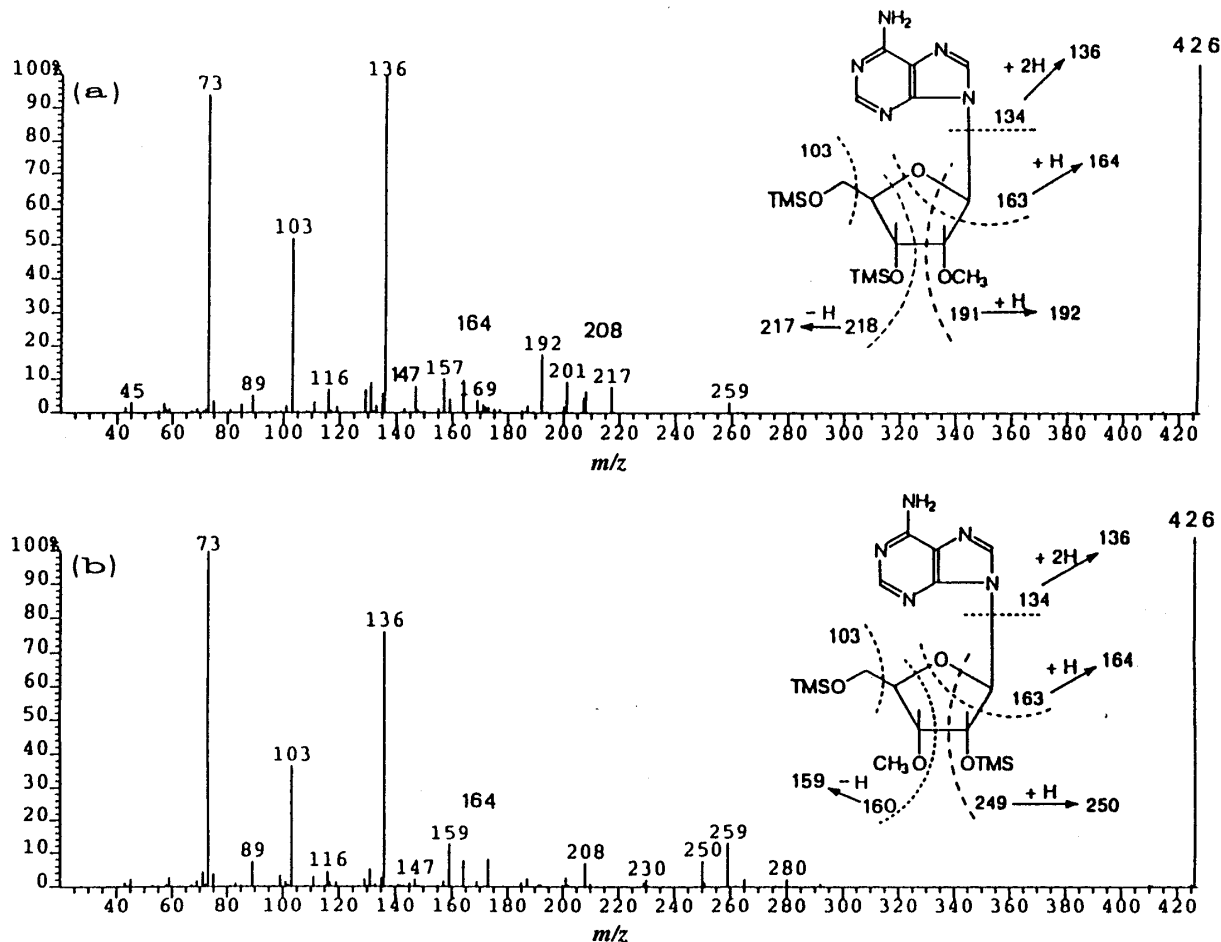


Fig. 1 MS/MS spectra of m/z 426 derived from FABMS of TMS derivatives of a : 1, b : 2

析装置 (EBE 型; E=電場, B=磁場), 日本電子製 JMS-SX/SX102A タンデム型質量分析装置 (BEBE 型) 及び VG Analytical 製 70-4SE タンデム型質量分析装置 (EBEB 型) を用い, それぞれの加速電圧を 5, 10 及び 8 kV として測定を行った. FABMS 測定には, 3-NBA をマトリックスとして, 高速キセノン原子 (6 keV) (70-4SE の場合には 35 keV に加速された Cs^+ イオンを使用) を用いてイオン化した. MS/MS スペクトル¹²⁾¹³⁾には衝突活性化ガスとしてアルゴンを用い, 目的のプリカーサーイオンのビーム強度が 1/4~1/5 に減少するまでガスセル内に導入した (70-4SE の場合にはヘリウムを使用). SX/SX102A 及び 70-4SE のガスセルは加速電圧の 1/2 の電圧 (それぞれ 5 及び 4 kV) にフロートした.

3 結果及び考察

3.1 2'-O-メチルアデノシン (1) 及び 3'-O-メチルアデノシン (2) の TMS 誘導体の FABMS 及び FABMS/MS スペクトル

1 及び 2 の TMS 誘導体の FABMS より, 共に m/z

426 (TMS_2) 及び m/z 498 (TMS_3) の擬分子イオンを与えたが, m/z 498 は時間とともに急激な減少を示した. 両化合物の主要ピークである m/z 426 の MS/MS スペクトルを測定したところ, Fig. 1 に示したように, Fig. 1, a の m/z 103, 164, 217 及び 192 と各々に対応する Fig. 1, b の m/z 103, 164, 159 及び 250 のフラグメントイオンより, 両異性体の識別も容易にできることが判明した. 更に, 二つの TMS 基は O-TMS として存在しており, NH-TMS が FABMS 測定条件下では選択的に外されることが分かった.

3.2 グアノシンの TMS 誘導体の FABMS 及び FABMS/MS スペクトル

グアノシンの TMS 誘導体の電子衝撃質量分析 (EIMS) より, m/z 643 (M^+) が得られたことから, 3 個の水酸基と 1 個のアミノ基及びアミド水素が TMS 化されたことが確認されたが (Fig. 2, a), FABMS スペクトル上には m/z 644 ($\text{M}+\text{H}^+$) はほとんど出現せず, TMS 基が 4 個導入された m/z 572 と TMS 基が 3 個導入された m/z 500 が主に検出された (Fig. 2, b). 前

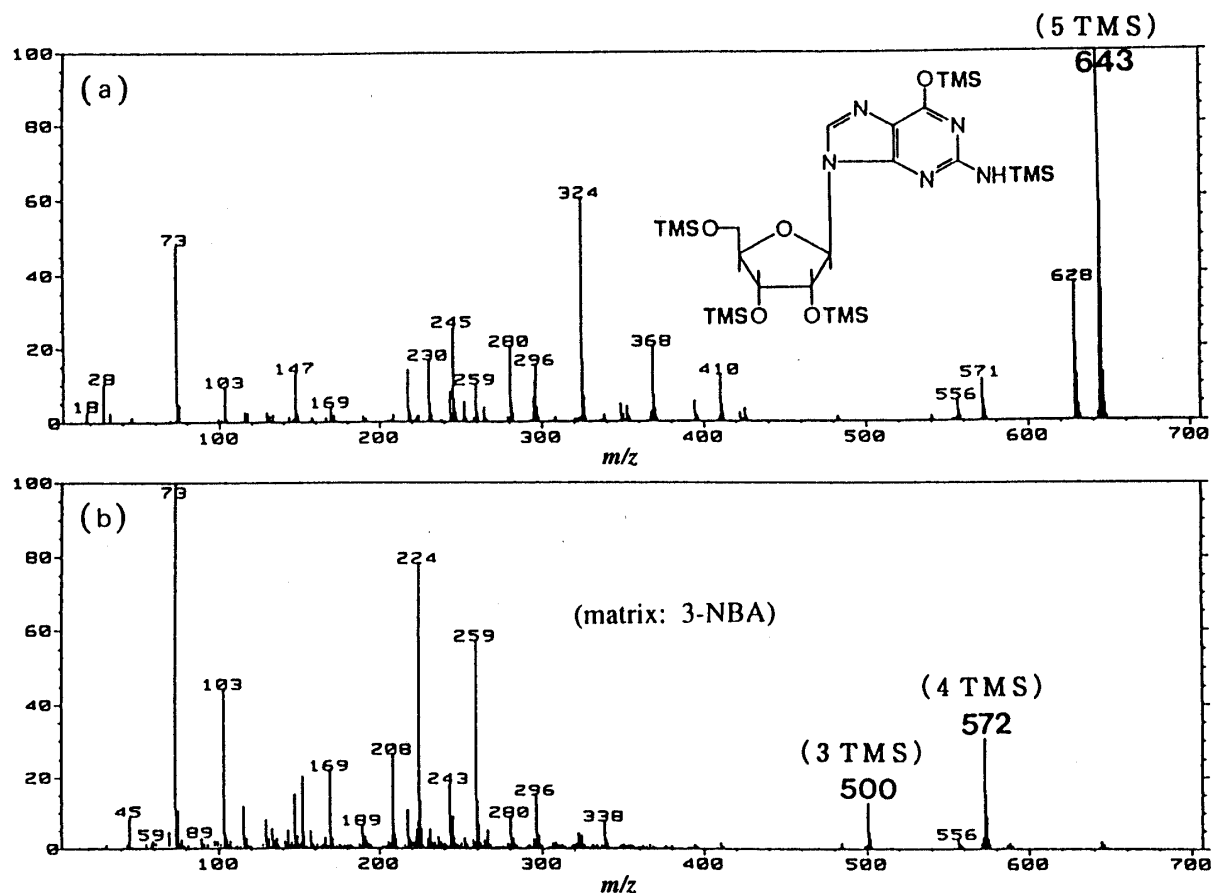


Fig. 2 EIMS (a) and FABMS (b) spectra of the TMS derivative of guanosine

述の化合物 1 及び 2 の場合には、選択的にアミノ基に導入された TMS 基が外されたことより、 m/z 572 (TMS_4) は 3 個のアルコール性の OH 及び 1 個のアミド酸素に導入された TMS 基が残ったものに対応していると考えることができる。又、 m/z 500 (TMS_3) は糖の部分の TMS 基のみが残っているイオンに相当することが MS/MS 測定によって明らかとなった。 m/z 572 及び 500 の MS/MS スペクトル及び各々の主なフラグメントイオンの起源を Fig. 3 に示した。

3.3 ウリジンの TMS 誘導体の FABMS 及び FABMS/MS スペクトル

EIMS スペクトルから m/z 532 (TMS_4) のピークが得られ、3 個のアルコール性の水酸基と 1 個のアミド水素が TMS 化されたことが確認されたウリジンの TMS 誘導体の FABMS スペクトルより、 m/z 533 (TMS_4)

及び m/z 461 (TMS_3) が検出された (イオン強度は m/z 533 < m/z 461)。それらの MS/MS スペクトル解析より、FABMS 測定上アルコール性の水酸基に導入された TMS 基は外れにくい、アミド水素に置換された TMS 基はやや外れやすいことが分かった。その両イオンの MS/MS スペクトル及び主な開裂様式を Fig. 4 に示した。

3.4 チロシンの TMS 誘導体の FABMS における挙動

EIMS で TMS 基が 3 個導入されたことを確認した試料 $\{(M+H)^+ 398, (M-CH_3)^+ 382\}$ について、3-NBA をマトリックスとして FABMS 測定をしたところ、 m/z 398 (TMS_3) 及び m/z 326 (TMS_2) は出現せず、 m/z 254 (TMS_1) のみが得られた。 m/z 254 の MS/MS スペクトルよりフェノール性の水酸基に導入さ

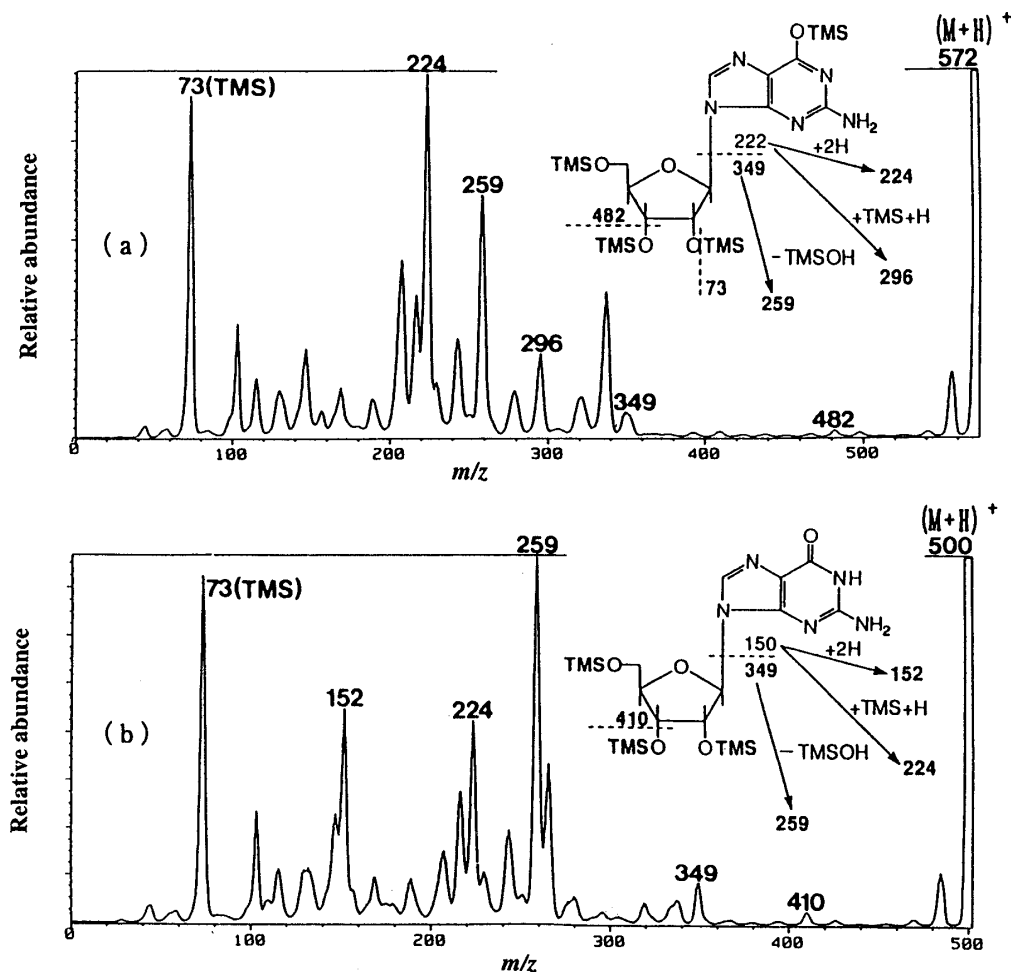


Fig. 3 MS/MS spectra of m/z 572 (a) and 500 (b) arising from FABMS of the TMS derivative of guanosine

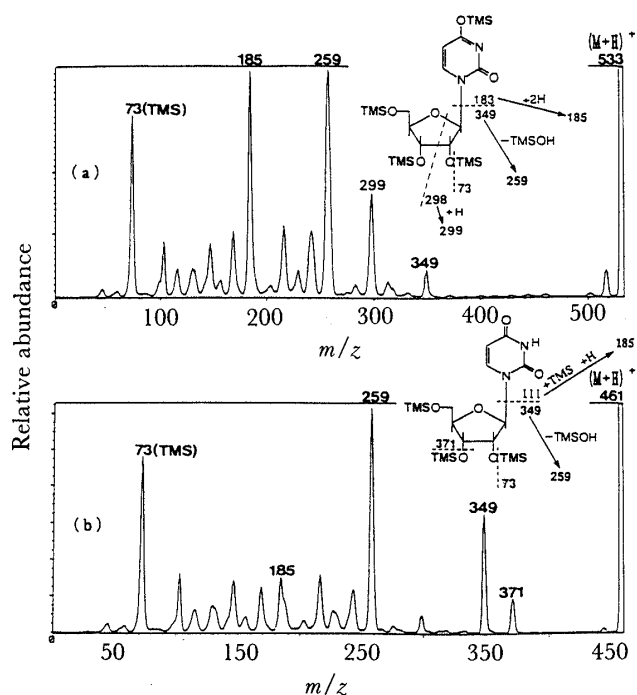


Fig. 4 MS/MS spectra of m/z 533 (a) and 461 (b) arising from FABMS of the TMS derivative of uridine

れた TMS 基のみが残っていることが分かり, このことはアミノ基とカルボン酸に導入されていた TMS 基が FABMS 測定条件下で非常に外れやすいことを意味している. なお, 比較のために, Fig. 5 にチロシンの位置異性体 (チロシン, メタ-チロシン及びオルト-チロシン) の TMS 誘導体の m/z 254 の MS/MS スペクトルを示したが, フリー体の場合¹⁴⁾と同様にスペクトルの強度パターンより, 3 種の位置異性体の判別も可能なことが判明した. 更に, チロシンの 3 種の官能基 ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ 及び $-\text{COOH}$) に対する FABMS 測定条件下でのシリル基の挙動を調べる意味で TMS 基よりも加水分解等に抵抗力を持つ, ターシアルブチルジメチルシリル ('BuDMS) を導入した化合物を用いて FABMS 測定を行い, 経時変化を調べたところ, m/z 296 ('BuDMS₁) が時間とともに出現し, 徐々にその強度を増していった. 又, m/z 410 ('BuDMS₂) の強度は一時的に増加し, その後ゆっくりと減少を示したが, m/z 524 ('BuDMS₃) のイオン強度は時間とともに急激な減少を示した (Fig. 6). これらのデータ及び 3 種のイオンの MS/MS スペクトルより, 窒素上のシリル基が最初に外れ, 次にカルボン酸に置換したシリル基が外れ, フェノール性の水酸基に導入されたシリル基は FAB 測定条件下でも安定に存在することが判明した. なお, 同じ試

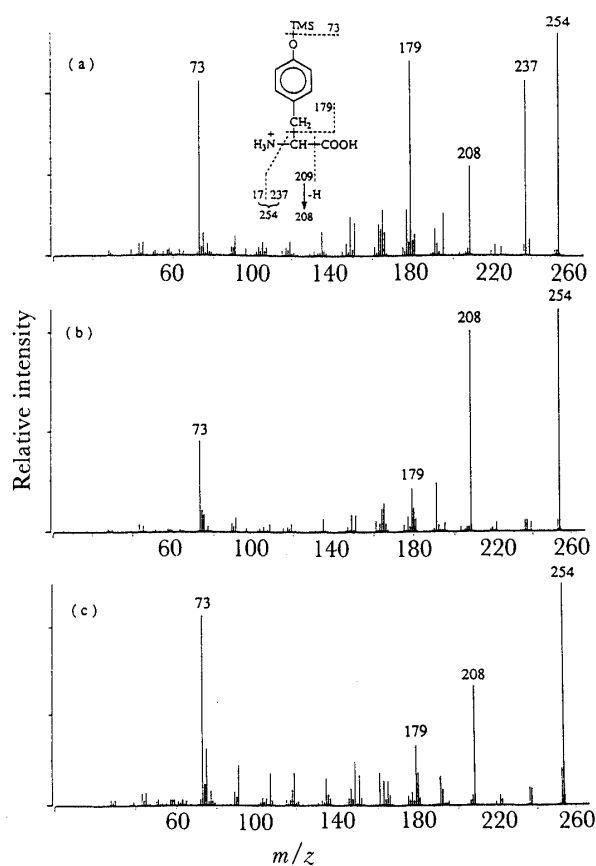


Fig. 5 MS/MS spectra of $(\text{M}+\text{H})^+$ ions at m/z 254 derived from FABMS of TMS derivatives of tyrosine (a), *meta*-tyrosine (b) and *ortho*-tyrosine (c)

料について活性水素を持たない 2-ニトロフェニルオクチル-エーテル (2-NPOE) をマトリックスとして FABMS 測定を行ったところ, 3-NBA では測定開始直後にしか得られなかったアミノ基に 'Bu-DMS 基が導入されたままのイオン (m/z 524) は 15 分後にも安定に存在していた.

3・5 システインの TMS 誘導体の FABMS における挙動

システインに TMS 基が 3 個導入されたことを EI MS で確認した試料 $[(\text{M}+\text{H})^+ 338]$ 及び $(\text{M}-\text{CH}_3)^+ 322$ が出現]を用いて FABMS 測定を行ったところ, アミノ基と SH 基に導入された TMS 基が外れ, カルボン酸にのみ TMS 基が残った m/z 194 (TMS₁) のみ短命ながら出現した (m/z 194 の MS/MS スペクトルより判定).

以上のように, 本研究では TMS 誘導体の FABMS 法及び FABMS/MS 法への有効性に着目し, ヌクレオ

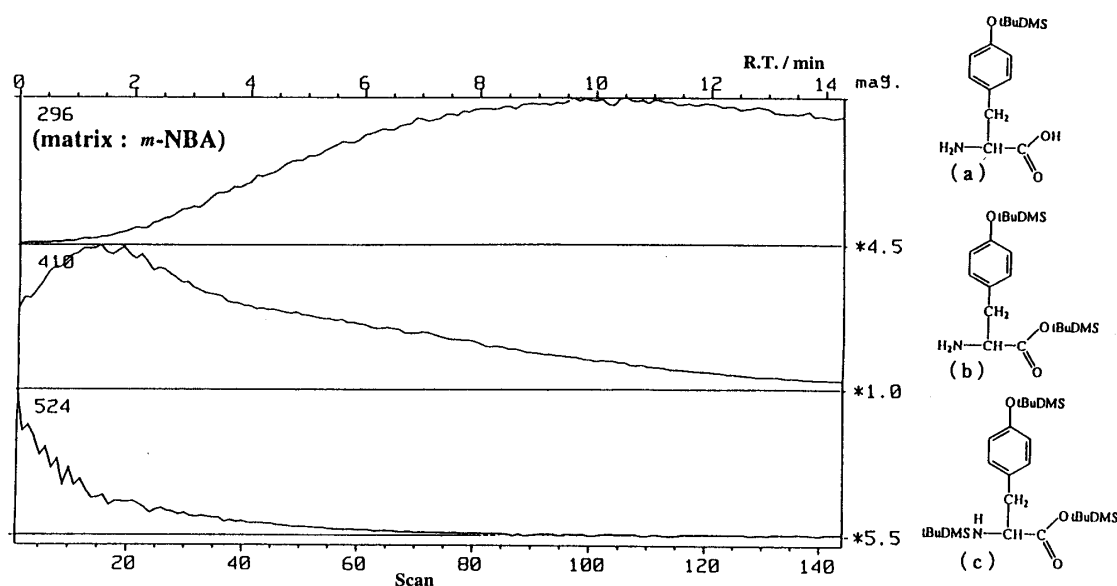
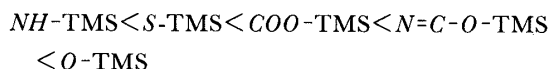


Fig. 6 Time courses of intensities of $(M+H)^+$ ions at m/z 296, 410 and 524 arising from FABMS of compounds, (a), (b) and (c)

チド類及びアミノ酸類の TMS 化体の測定を行った。その結果、TMS 誘導体の EIMS スペクトルでは $(M-15)^+$, M^+ , $(M+H)^+$ と分子イオンの現れ方が、化合物によって異なるのに対し、FABMS スペクトルからは分子イオンに関する情報が $(M+H)^+$ としてはっきりと得られてくることが分かった。又、種々の活性水素に導入された TMS 基の FABMS 測定条件下での次のような安定性の順序から、アルコール性の OH 基の数や NH 基, SH 基, カルボン酸及びアミド水素の有無等が推定できることが判明した。



更に、TMS 誘導体の FABMS スペクトルが比較的長時間安定に得られることより、FABMS/MS 測定が容易に行え、OH, NH 等々の結合位置が推定できるばかりでなく、その他の構造解析に必要な情報が十分に得られることが確認された。なお、マトリックスに 3-NBA を用いた FABMS スペクトルで TMS 基が H に置換される要因として、一部、加水分解やマトリックスの活性水素との置換反応も考えられるが、以下に述べる理由により還元反応が大きな要因を占めていると考えられる。すなわち、加水分解等を受けにくい 'BuDMS 誘導体でも TMS 基と同様な現象が見られること、又過剰なシリル化剤を用いてもシリル基が外れる現象に影響を与えない

ことより、加水分解が主役とは考えにくい。更に通常 FABMS 測定条件下では還元反応を起こさない 2-NPOE をマトリックスにしたときには TMS 基が外れないことや、又 3-NBA と比較してより還元反応が FABMS 測定条件下で生じやすいことが知られている。グリセロールをマトリックスにしたときには、TMS 基の外れやすさは加速されるが、マトリックスが TMS 化を受けたピークの増大や、特に他の新たなピークの出現も見受けられないので、単なる交換反応や副反応が支配しているとも考えにくい。以上のことより、キノン類や S-S 結合等々の FABMS 測定条件下での還元反応^{15)~18)}と同様な還元反応を TMS 誘導体も受けていると考えられる。

(1994 年 9 月及び 1995 年 9 月, 日本医用)
(マスペクトル学会において一部発表)

文 献

- 1) 立松 晃, 宮崎 浩, 鈴木真言: "医学と薬学のためのマスペクトロメトリー", p. 166 (1975), (講談社).
- 2) W. C. Chang, S. Murota, S. Tsurufuji: *Prostaglandins*, **13**, 17 (1977).
- 3) H. Haruyama, H. Kuwano, T. Kinoshita, A. Terahara, T. Nishigaki, C. Tamura: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1459 (1986).
- 4) M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler: *Nature* (London), **293**, 270 (1981).
- 5) T. Kinoshita, H. Nagaki, M. Nakajima, M. Inu-

- kai: *Mass Spectroscopy*, **32**, 169 (1984).
- 6) T. Nakamura, H. Nagaki, T. Kinoshita: *Ann. Rep. Sankyo Res. Lab.*, **36**, 178 (1984).
 - 7) K. H. Schram, D. L. Slowikowski: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **13**, 263 (1986).
 - 8) Q-M. Weng, W. M. Hammargren, D. Slowikowski, K. H. Schram, K. Z. Borysko, L. L. Wotring, L. B. Townsend: *Anal. Biochem.*, **178**, 102 (1989).
 - 9) D. M. Reddy, P. F. Crain, C. G. Edmonds, R. Gupta, T. Hashizume, K. O. Stetter, F. Widdel, J. A. McCloskey: *Nucleic Acids Res.*, **20**, 5607 (1992).
 - 10) 河添香代子, 小坂俊幸, 石川富雄, 丸山康子, 高澤智子, 木下 武: 日本医用マススペクトル学会講演集, p. 85 (1994).
 - 11) 鳥居香代子, 高澤智子, 池田智子, 石川富雄, 小坂俊幸, 木下 武: 日本医用マススペクトル学会講演集, p. 143 (1995).
 - 12) F. W. McLafferty (Ed.): "*Tandem Mass Spectrometry*", (1983), (Wiley-Interscience, New York).
 - 13) 酒井郁男, 木下 武: "質量分析法の新展開", 現代化学増刊 15 号, p. 90 (1988), 東京化学同人.
 - 14) T. Kinoshita, K. Nakamura: *Ann. Rep. Sankyo Res. Lab.*, **41**, 1 (1989).
 - 15) S. K. Sethi, C. C. Nelson and J. A. McCloskey: *Anal. Chem.*, **56**, 1975 (1984).
 - 16) T. Nakamura, H. Nagaki, T. Kinoshita: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 2798 (1985).
 - 17) H. Haruyama, Y. Ohkuma, H. Nagaki, T. Ogita, K. Tamaki, T. Kinoshita: *J. Antibiotics*, **47**, 1473 (1994).
 - 18) J-L. Aubagnac, I. Gilles, R. Lazaro, R-M. Claramunt, G. Gosselin, J. Martinez: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 509 (1995).

要 旨

OH, NH 基等を有する生体関連化合物のトリメチルシリル (TMS) 誘導体を高速原子衝撃質量分析 (FABMS) 法及び FAB タンデム質量分析 (MS/MS) 法へ応用し, GC/MS 法において非常に有効に使われてきている TMS 誘導体が FAB 法においても有力な手段となり得るかどうかの検討を行った. その結果, TMS 誘導体が感度よく擬分子イオンを与えるばかりでなく, FABMS 測定条件下での TMS 基の外れやすさの差によって, 活性水素を持つ種々の官能基 (OH, NH, SH, CONH 及び COOH) の簡便な識別法ともなり得ること及びそれらの官能基数をも明らかにすることができることが判明した. 又, FABMS/MS 法により TMS 誘導体がそれらのフリー体の構造解析に非常に役立つことが分かった. なお, FABMS 用のマトリックスとしては, TMS 化反応溶液と混合しやすい 3-ニトロベンジルアルコール (3-NBA) を主として用いた.