

## 報 文

## 質量分析法による有機化学反応中間体の構造解析

大西 淳<sup>®\*</sup>, 渡辺 裕幸\*, 奥田 潤\*

## Structure analysis of reaction intermediates using mass spectrometry

Jun OONISHI, Hiroyuki WATANABE and Jun OKUDA\*

\*Ashigara Research Laboratories, Fuji Photo Film Co., Ltd., 210,  
Nakanuma, Minamiashigara-shi, Kanagawa 250-01

(Received 10 January 1996, Accepted 29 February 1996)

Characterization of reaction intermediates formed during organic reactions is essential to understand the mechanisms of chemical reactions. We developed two methods to analyze and determine chemical structures of reaction intermediates using mass spectrometry. The one is "a FRIT-FAB LC/MS method" which consists of a fast atom bombardment mass spectrometer (FAB-MS: JEOL Model DX-303) connected to an HPLC via a pneumatic splitting interface. To perform LC/MS analysis, HPLC effluent was introduced into the mass spectrometer after mixing triethylene glycol as a matrix modifier. The FAB-MS was operated by applying an accelerating voltage of 3 kV. The emission current and the voltage of the FAB gun was controlled to 10 mA and 4 kV, respectively. This method enables the detection of reaction having intermediates with more than 1 minute of life time. The other is "a Flow direct injection FAB-MS method (FDI/FAB-MS)". After mixing the solutions with two pistons continuously, the mixed solution is introduced into the FRIT-FAB mass spectrometer. The reaction time is controlled by changing the path-length of the sampling loops and the velocity of the flow rate. This is a suitable method by which to detect and estimate chemical structures of relatively short life time intermediates (more than a few seconds). Using these methods, we observed the oxidation reaction of hydrazine with quinone and clarifying the reaction scheme and confirming the validity of these methods.

**Keywords** : reaction intermediates; FRIT-FAB LC/MS; Flow direct injection FAB/MS; the oxidation reaction of hydrazine with quinone.

## 1 緒 言

写真材料に使われる有機機能性素材の開発研究には、分子設計され合成されてきた素材が意図どおり化学反応するかを知ることが重要である。この化学反応解析には、反応生成物解析をはじめ、化学反応の速度論的解析、更に反応中間体の確認・構造解析などが必要であ

る。このうち反応中間体は、一般に反応活性が高く寿命が短いことから単離が難しく、構造解析は特に難しいとされてきた。

一方溶液中の化学反応を追跡・解析する手法は数多くあり、反応生成物の単離・構造解析から反応過程を推定する方法、反応速度論的解析には用いられるストップトフロー/UV-Vis法などが代表的なものである。又、質量分析(以下MSと略す)の分野ではメンブランフィルターを用いたフローインジェクション/化学イオン化

\* 富士写真フイルム(株)足柄研究所: 250-01 神奈川県南足柄市中沼 210

MS 法が文献で紹介され、比較的分子化合物の反応生成物の検出法として注目された<sup>1)2)</sup>。しかしこれらは主として安定な生成物の観測手法であり、反応過程における不安定な反応中間体の化学構造情報を知るには分子イオンを確実に捕そくすることが難しいため手法的にもまだ不十分であり、得られる構造情報も比較的乏しかった。

上記のような化学反応の制御や基礎研究には更に詳細で高度な反応機構解析が必要になってきており、反応過程における不安定な反応中間体の検出・構造解析を可能とする手法が強く望まれている。著者らは反応中間体の構造解析を可能にする手法として、フローダイレクトインジェクション/質量分析 (FDI/MS) 法と液体クロマトグラフィー/高速原子衝撃イオン化質量分析 (LC/FRIT-FAB MS) 法の開発と応用を検討した。

## 2 実 験

### 2.1 装置及び測定条件

FDI/MS 法における FDI 部の反応液送液用に Harvard 製 2 連シリンジポンプ 22 型を使用した。反応液混合には T 字型ミキサーを用い、送液にはジーエルサイエンス製のテフロンチューブ内径 0.25 mm、長さ 5~200 cm を 6 本用意し、接続にはレオダイン製の選択 6 方バルブ 2 個で接続した。MS への送液には、メタノール-水=95:5 の混合溶媒と反応液とを混合して FRIT-FAB MS インターフェースに送液した。その概略図を Fig. 1 に示す。

FRIT-FAB MS 測定は、日本電子製空圧スプリッター式インターフェースを介した同社製 JMS DX-303 型 MS を用い、試料マトリックスにはトリエチレングリコールを使用した。FRIT-FAB 測定はイオン源温度 50°C、FAB ガンエミッション電流 10 mA、Xe 加速電圧 4 kV、イオン加速電圧 3 kV、1 秒/scan ( $m/z$  50~800) で行った。

FDI/MS 法と併せて利用した衝突活性化分解 (CAD) 質量スペクトル<sup>3)~7)</sup>は、linked scan 法<sup>8)</sup>によった。CAD 用の collision ガスは He ガスを用い、ガス圧は約  $1\sim 5 \times 10^{-3}$  Pa 前後とした。

LC/MS 測定はカラムに TSK-gel ODS 80TM (2.0×250 mm) を用い、移動相にはメタノール-水の混合液に 0.1% のトリエチルアミン-酢酸を加えたものを用いた。ポストカラムで試料マトリックスのトリエチレングリコールを混合後、FRIT-FAB と同様の条件で測定を行った。

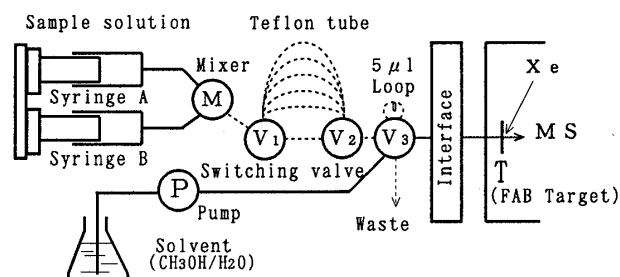


Fig. 1 The schematic diagram of the FDI/MS system

### 2.2 試料

試料には、*N*'-ホルミル-*N*-(4-アシルアミノフェニル)ヒドラジン (AFH) を用いた。酸化剤として 2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-*p*-ベンゾキノン (DDQ, 和光純薬製) を用いた。試薬を溶かす溶媒及び移動相に用いるメタノールは蒸留したものを、水はイオン交換水を使用した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 測定手法と条件の検討

**3.1.1 短寿命反応中間体解析法としての FDI/MS 法** 短寿命反応中間体検出法としての FDI/MS 法は、以下の手順で測定を行う。① 反応混合液を反応開始後なるべく速く観測できるよう試料導入系を工夫し、混合後一定時間後の試料液を直接 MS 測定を行う。② サンプルング時間を変化させてデータを取り、測定データをデータ処理して反応中間体の擬分子イオンを識別する。③ この識別した擬分子イオンに注目して linked scan 測定法を用い、反応中間体の CAD 質量スペクトルを得る目的とする反応中間体の構造解析を行う。具体的な操作について以下に述べる。Fig. 1 のシリンジ A, B にそれぞれ反応液を入れ、一定流量で送液してミキサー M で混合した後、反応液を質量分析計へ送る。テフロンチューブの長さを 5, 25, 50, 100, 150, 200 cm と六通り設け、質量分析計へ送るサンプルング時間を変化させた。必要に応じて流量を変更し、更に詳細なデータが取れるようにした。経路長の切り換えは選択 6 方バルブ V1 と V2 を利用し、反応液がミキサー M を通り FAB ターゲット T までの通過時間を加算したものが反応時間となる。通過時間は、選択 6 方バルブ V1 と V2 との間にテフロンチューブを 5 m つなぎ LC 用インジェクター・UV 検出器を用いてあらかじめ通過時間を測定し、比例計算から算出した。反応の初期過程を

観測するためには, 固定となっている 6 方バルブ V3 からインターフェースを通り FAB ターゲット T に至る長さを可能な限り短くすることが望ましく, 特にインターフェースと FAB ターゲット T をつなぐキャピラリーを最適化する必要があった. このためキャピラリーの内径を 50  $\mu\text{m}$  以下にしてキャピラリー長を 20 cm まで短縮し, しかも測定可能なイオン源真空度が得られた. このようにして反応後 5 秒以上であれば反応生成物が観測が可能となった. 以上のように設定した各反応時間における反応生成物をそのまま FRIT-FAB MS に送っても再現の良いデータは得られなかったため, 間欠試料導入法を用いて再現性の良いデータを得ることを試みた. 間欠試料導入法とは, 選択 6 方バルブ V2 から出る反応液を 6 方バルブ V3 に付けた 5  $\mu\text{l}$  のループに送り, 常にループ内に同じ反応時間を経た反応液が満たされるようにしておく. そしてこのループ内の反応液をバルブを回転して何度か LC ポンプより送液した移動相と共に送液混合して FRIT-FAB MS に導入する. この操作を 4~5 回繰り返すことにより, 再現性の良好なデータを得る試みである. 反応開始時点に相当するデータは, シリンジポンプ A に反応にあずかる化合物, シリンジポンプ B に溶媒のみを入れて同様に測定して得た. 以上のようにして得られたデータから, マスクロマトグラムデータ処理や三次元データ処理を行い, イオン強度の増減に特徴ある質量数を探索して反応中間体 (正確には反応中間体の擬分子イオン) を識別する. 識別したこれら反応中間体各々の擬分子イオンを標的にして linked scan 測定法を用い, 反応中間体に相当する CAD 質量スペクトルを得る. この CAD 質量スペクトルから反応中間体の構造推定が可能となる. 装置上の制約から linked scan 測定では良好な繰り返し再現性が得られないため, 反応液を定常状態に保って scan 測定する必要があった. このため 5  $\mu\text{l}$  ループ付き 6 方バルブ V3 を省略し, 反応混合液自身を移動相として利用し, continuous flow として直接反応液をインターフェースに導入して質量スペクトルを得た. この方法により反応後 5 秒前後から 1 分程度の反応中間体を検知し, 構造を推定することが可能となった.

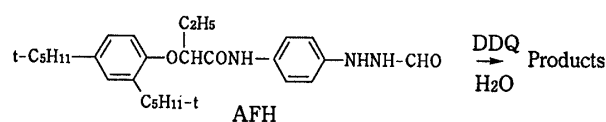
**3.1.2 比較的長寿命中間体解析法としての LC/MS 法** LC/MS 法は, 有機化合物の分離・構造解析をオンラインでできる優れた手段である. この LC/MS 法を反応中間体解析に利用すると, クロマト的に反応中間体が反応共存物質から分離されて中間体の寿命が延び, その直後にオンラインで MS 測定ができるために反応中間体の構造解析が容易になることが期待される. この

目的で検討を進め, 特に移動相の溶媒組成について最適化を行った. 移動相溶媒として一般的に用いられる水が比較的多い溶媒組成では LC 展開中に反応が進行することが多く, メタノールやアセトニトリルなどの有機溶媒組成比の高い移動相が良い. しかしピーク保持不足による分離不良を招くため, カラム長を 250 mm まで伸ばして分離能を稼ぐ必要があった. 試料導入は, 反応液を混合後一定時間経過した反応液をマイクロシリンジで通常どおり LC インジェクターに導入した. このようにしても LC カラム展開中にかなり反応が進行することもあった. この方法により少なくとも寿命が約 1 分以上の反応中間体を反応共存物質から分離し LC/MS 検出が可能となった. 通常化学反応は反応系の pH, 濃度などを変えることにより反応速度のある程度の制御が可能なることから, 上記条件を選ぶことにより種々の反応系へ応用できるものと思われる.

### 3.2 応 用

今回の応用例として, 印刷用白黒感光材料の現像時に銀造核作用を有する造核剤のモデル酸化反応を取り上げ, その酸化反応機構解析を行った. 造核剤は試薬の項で述べた AFH を, 又酸化剤は DDQ を用いた. AFH の 1 mM メタノール-水系溶液と DDQ の 5 mM メタノール溶液を混合しその酸化反応 Eqn. 1 を観測し, 岡村らにより既に提唱されている *N'*-ホルミル-*N*-アリルジアゼンや造核活性種である *N*-アリルジアゼン反応中間体の存在の確認を試みた<sup>9)10)</sup>.

**3.2.1 短寿命反応中間体の確認** 3.1.1 に述べた方法により, 観測する反応時間のデータポイントを 5.3 秒から 75 秒間にかけて 10 点を選択して測定した. 処理データから増減に特徴を有する擬分子イオンのマスクロマトグラムを選び, 各点 ( $n=5$ ) の強度の平均値を時間軸にプロットしたものを Fig. 2 に示す. 図から擬分子イオン  $m/z$  452 は非常に短寿命で (AFH) -  $\text{H}_2 + \text{H}$  に相当することからヒドラジン (AFH) の酸化体の *N'*-ホルミル-*N*-(4-アシルアミノフェニル)ジアゼンであることが容易に推定される. 最も特徴的な擬分子イオンは  $m/z$  424 であり, 1 分のあいだに増加して減少する典型



Eqn. 1 Reaction scheme of AFH with DDQ

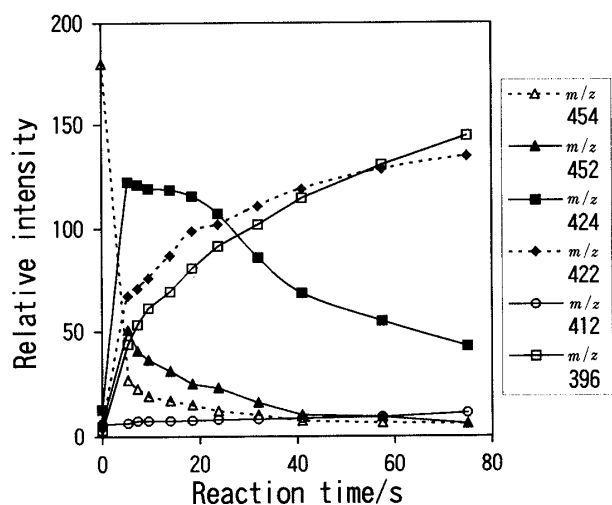


Fig. 2 Relative intensity of intermediate quasi molecular ions plotted against reaction time obtained from chromatograms

的な反応中間体の振る舞いを示している。この擬分子イオン  $m/z$  424 を標的にして、反応開始後 5.3 秒時点の linked scan 測定を行い、CAD 質量スペクトルを得た (Fig. 3, a)。比較参考として AFH 及び 5.3 秒時点の混合スペクトルも示す (Fig. 3, b, c)。擬分子イオン  $m/z$  424 の CAD 質量スペクトル (Fig. 3, a) の低質量側に  $m/z$  205, 233, 245, 275 などアシル基を明確に示すフラグメントが見られる。又、一次フラグメントと思われる  $m/z$  394 は擬分子イオンから  $\text{H}_2\text{N}_2$  (質量 30) の離脱を示唆している。 $m/z$  365, 324 は  $m/z$  394 からの二次フラグメントのようであり、アシル基から  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_5\text{H}_{10}$  が脱離したものであると考えられる。これらから反応中間体擬分子イオン  $m/z$  424 の構造は酸化加水分解で生じる *N*-(4-アシルアミノフェニル)ジアゼンであることが確認された。このジアゼンは写真現像過程の重要な造核活性種であることが既に提唱されているが、今回検討した手法により直接的にジアゼンの構造を確認できた。ジアゼンよりも寿命の長い擬分子イオン  $m/z$  422 についても反応開始後 75 秒時点で同様に linked scan 測定した結果、*N*-(4-アシルアミノフェニル)ジアゾニウム陽イオンと推定した (Fig. 4)。反応は更に進行して擬分子イオン  $m/z$  396, 412 などに分解し、これらは、アシルアニリド、*N*-(4-ヒドロキシフェニル)アシルアミドと推定した。以上、比較的短寿命でありかつ不安定であるため単離困難な反応中間体を、FDI/MS 法と CAD 質量スペクトル法の組み合わせで構造推定・確認することができ、この手法が反応機構解析に有効な一つの方法で

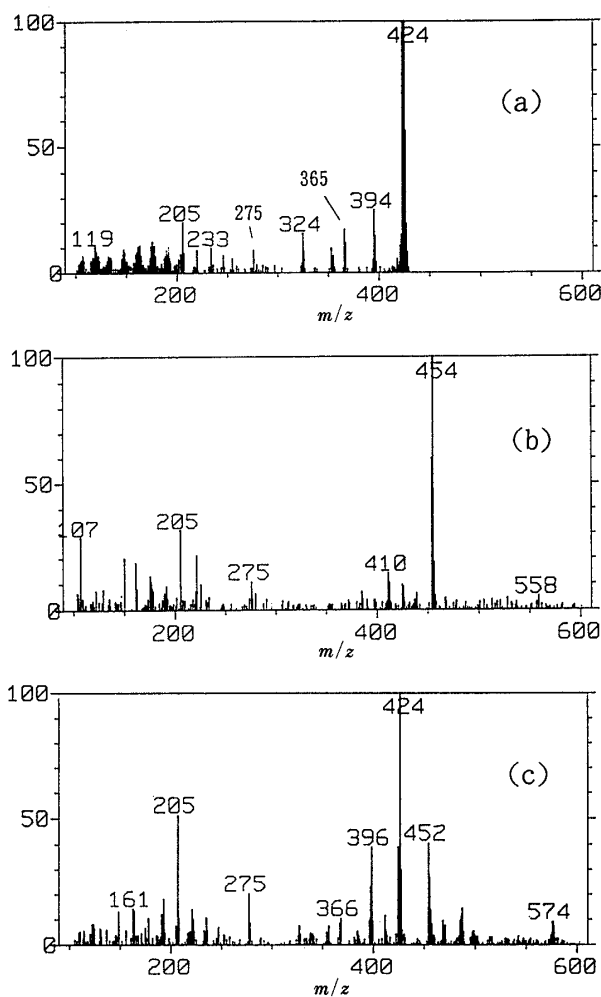


Fig. 3 (a) CAD Mass spectra (B/E constant linked scan) of the intermediate ion 424 at the reaction time of 5.3 s, (b) FAB mass spectra of AFH, (c) FAB mass spectra of mixture at the reaction time of 5.3 s

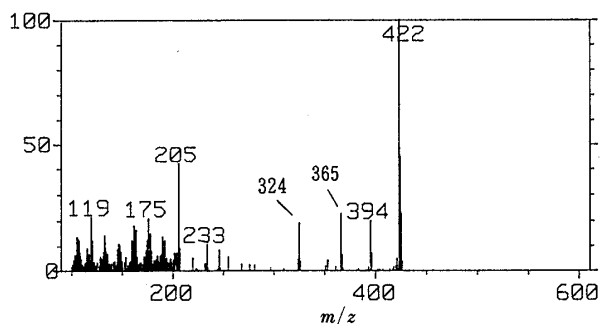


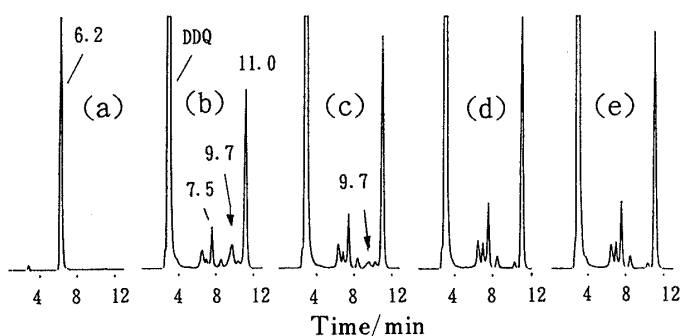
Fig. 4 CAD Mass spectrum (B/E constant linked scan) of the intermediate ion(diazonium ion) at the reaction time of 75 s

あることが判明した。

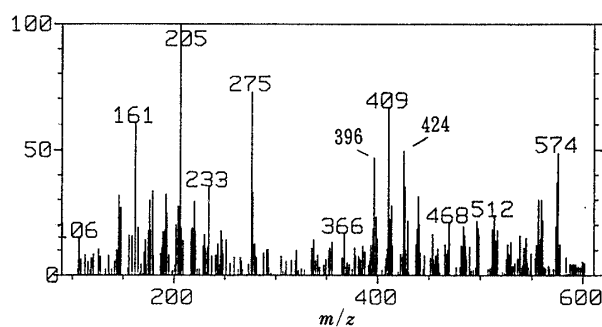
**3・2・2 比較的長寿命中間体の確認** 次に比較的長寿命中間体の確認を 3・1・2 で述べた LC/MS 測定を 3・2・1 で用いたのと同じ反応溶液を使用して行った。AFH と DDQ 溶液を室温で等容量混合した直後にその 5  $\mu$ l を LC/MS に導入して得られたクロマトグラムを Fig. 5 に示す。 $R_t$  9.7 分のところに反応中間体が検出された。しかし検出強度は弱く、これは短寿命故にかなり減衰した時点での観測結果と考えられる。このものの FAB-MS スペクトルを Fig. 6 に示す。 $m/z$  424 は、*N*-(4-アシルアミノフェニル)ジアゼンの ( $M+H$ )<sup>+</sup> であり、 $m/z$  574 はそのジアゼンの一部が試料マトリックスのトリエチレングリコールと付加反応した化合物の  $M+H$  でありクラスターイオンではないと考えられる。その付加反応物のフラグメントと考えられる  $m/z$  409 は *N*-アシル、*p*-フェニレンジイミン、 $m/z$  396 はアシルアニリド、 $m/z$  205, 233, 275 はアシル基を示唆している。反応開始後約 1 分の LC/MS 測定から、反応生成物としてアシルアニリド ( $R_t=11$  分)、*N*-(4-ヒドロキシフェニル)アシルアミド ( $R_t=7.5$  分) などを確認した。更に 3, 10 分後の後続反応で反応中間体自身の縮合物、加水分解生成物と思われる *N*-(2,4-ジヒドロキシフェニル)アシルアミド ( $R_t=6.9$  分) を確認した。以上のように LC/MS による有機化学反応の反応中間体解析は、比較的長寿命 (約 60 秒以上) の反応中間体に対して有効な方法である。

**3・2・3 反応機構の推定** これまで述べてきた FDI/MS 法、及び LC/MS 法による結果から反応機構を Eqn. 2 のように推定した。FDI/MS 法による解析から、AFH は酸化により非常に短寿命の *N*'-ホルミル-*N*-アリルジアゼン (1) を経て、直ちに加水分解され蟻酸を放出してアリルジアゼン (2) を生成する。このアリルジアゼンも比較的寿命が短く、Fig. 3 の生成イオン強度変化から見積もれば半減期は約 30 秒程度と考えられる。アリルジアゼンが更に酸化を受けてジアゾニウム陽イオン (3) となる。そして更に加水分解して *N*-(4-ヒドロキシフェニル)アシルアミド (5) を生成すると推定した。一方アリルジアゼン (2) から脱窒素分解によりアシルアニリド (4) を生成する反応経路も見られた。LC/MS 法による解析では生成物 (4), (5) などが明確に再確認され、後続反応で生成する *N*-(2,4-ジヒドロキシフェニル)アシルアミド (6) への反応経路も認められた。これは (5) の酸化によりキノニンイミンを生成した後、加水分解反応が進行したものと推定している。

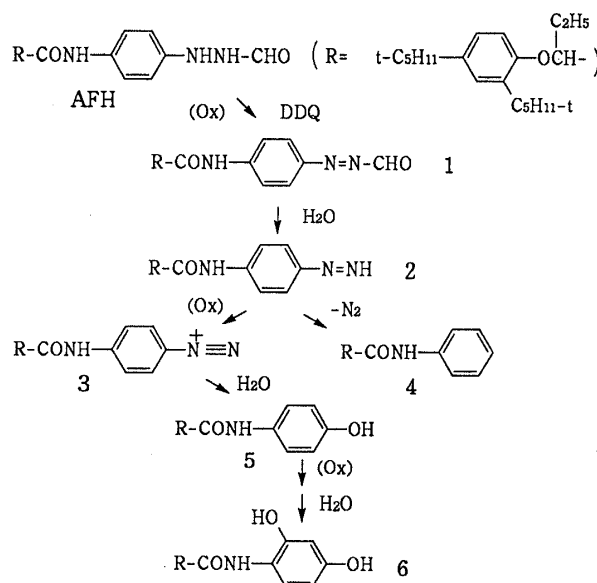
**3・2・4 本法の適用範囲** このような FDI/MS 法、



**Fig. 5** The variation of the chromatogram with time after mixing AFH with DDQ  
a: blank (AFH only); b: immediately after mixing (20~30 s); c: 1 min; d: 3 min; e: 10 min



**Fig. 6** LC/FRIT-FAB MS spectrum of intermediate ion at the retention time of 9.7 min in Fig. 5-b



**Eqn. 2** Estimated reaction mechanism of AFH with DDQ

LC/MS 法による反応中間体構造解析は、酸化・還元反応や付加、縮合反応などの一般的な溶液反応に広く応用できる。反応系の試料濃度は化合物にもよるが 0.1~1 mM 以上で十分検出が可能と思われる。又、温度、pH などの制約は少なく、用いる溶媒については水と混合可能であれば原則的に適用可能である。但し、無機塩が共存する系においては FDI/MS 法は困難であり、LC/FRIT-FAB MS 法を利用する。そのときの塩濃度は分離能との兼ね合いで 0.1~0.5 mM 程度に抑えて、LC 分離で初期溶出する無機塩をインターフェースでスプリット除去すれば適用可能である。

(1993 年 10 月, 日本分析化学会第 42 年会及び 1994 年 10 月, 日本分析化学会第 43 年会において一部発表)

### 文 献

- 1) M. J. Hayward, T. Kotiaho, A. K. Lister, R. G. Cooks, G. D. Austin, R. Narayan, G. T. Tsao: *Anal. Chem.*, **62**, 1798 (1990).
- 2) G. J. Tsai, G. D. Austin, M. J. Syu, G. T. Tsao, M. J. Hayward, T. Kotiaho, R. G. Cooks: *Anal. Chem.*, **63**, 2460 (1991).
- 3) F. W. McLafferty, R. Kornfeld, W. F. Haddon, K. Levsen, I. Sakai, P. F. Bente III, S-C. Tsai, H. D. R. Schuddemage: *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 3886 (1973).
- 4) F. W. McLafferty, P. F. Bente III, R. Kornfeld, S-C. Tsai, I. Howe: *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 2120 (1973).
- 5) F. W. McLafferty, I. Sakai: *Org. Mass. Spectrom.*, **7**, 971 (1973).
- 6) K. Levsen, H. Schwarz: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **15**, 509 (1976).
- 7) 酒井郁男: 質量分析, **26**, 233 (1978).
- 8) A. P. Bruins, K. R. Jennings, S. Evans: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **26**, 395 (1978).
- 9) 岡村 寿: 日本写真学会誌, **55**, 211 (1992).
- 10) 岡村 寿: *Fuji Film Research and Development.*, **39**, 52 (1994).

### 要 旨

溶液中の有機化学反応で生成する比較的短寿命の反応中間体の構造解析を狙い、フローダイレクトインジェクション/質量分析 (FDI/MS) 法及び液体クロマトグラフィー/高速原子衝撃イオン化質量分析 (LC/FRIT-FAB MS) 法を検討した。その結果、反応中間体の寿命が数~60 秒のものは FDI/MS 法で、1 分以上では LC/FRIT-FAB MS 法で、反応中間体の質量スペクトルを得ることが可能となった。これらの手法開発で不安定な反応中間体の化学構造解析が可能となり、本法が溶液系の有機化学反応機構解析手法の一つとして広範囲に利用されることが期待できる。