

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410057

研究課題名(和文)MALDI法の特質を生かしたCIEEL型化学励起反応の素過程解析

研究課題名(英文)Analysis of elementary process for chemi-excitation of CIEEL type dioxetanes by the use of photo-induced ionization in MALDI

研究代表者

伊集院 久子(Ijuin, Hisako)

神奈川大学・付置研究所・研究員

研究者番号：60398948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：CIEEL型ジオキセタンはCTID機構で効率良く発光し、この機構において生成するはずのラジカルイオン種の検出を負イオンモードMALDIを用いて試みた。分子内にアンテナとなり得る芳香族置換基を有するフェノール置換ジオキセタン化合物では、マトリックスからアンテナ部位への電子移動によりラジカルアニオン経由のフラグメンテーションが進行する。本研究では、アンテナ部位を有するフェノール置換双環性ジオキセタンがMALDI条件下ケトエステルに分解し、芳香族エステルでなくケトン側が励起することを見出した。一方、標品ケトエステルも衝突誘起解離により振動励起状態になり、ケトン側からの分解が進行することが分かった。

研究成果の概要(英文)：CIEEL active dioxetanes bearing an aromatic electron donor display chemiluminescence by CTID mechanism, in which CT occurs from the electron donor to dioxetane 0-0 to produce excited species. We have recently found that CTID occurred for dioxetanes bearing a hydroxyphenyl moiety substituted further with an aryl that acted as an antenna to capture an electron from a matrix in negative-mode MALDI-TOF-Mass. In this work, we found that a bicyclic dioxetane bearing a phenol with such antenna captured an electron from matrix to decompose a keto ester, in which the ketone moiety but not the aromatic ester was in the an excited state. On the other hand, a vibrationally excited keto ester formed by collision induced dissociation in MS/MS. In the course of such investigation of dioxetanes we found that a quinacridone derivative was useful as a new matrix under negative-mode. When a planar organic base such as phenazine is added to matrix the ionization efficiency is markedly improved.

研究分野：有機化学

キーワード：化学発光 MALDI法質量分析 ジオキセタン ラジカルイオン種 電子移動

1. 研究開始当初の背景

(1) 生物発光・化学発光の多くは次のような素過程を経て一重項化学励起が起こるとする CIEEL 機構 (Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence) が提唱されている。
 1). 2) 即ち(1)電子供与体(ED)からのペルオキシ結合への電子移動(ET)、(2)ジオキセタン環の解裂によるラジカルアニオン種 ($R^{\cdot-}$) とラジカルカチオン種 ($R^{\cdot+}$) (あるいはラジカル) の生成、(3)ラジカルアニオン種からラジカルカチオン種への逆電子移動(BET)により一重項励起カルボニルが生成するとしている。しかし、CIEEL 機構が提唱されて以来、ラジカルアニオン種の存在は明確に示されてはいない。

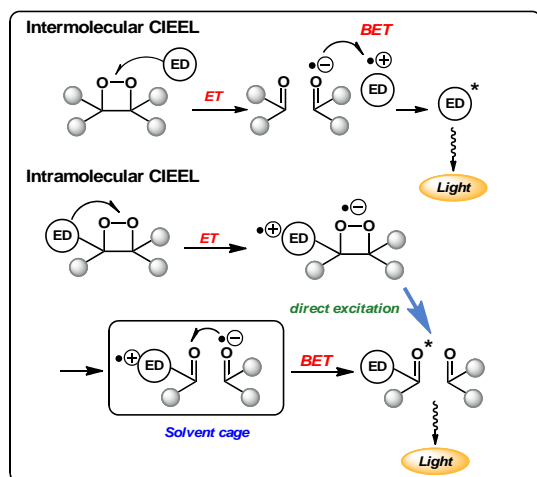


Fig. 1. CIEEL (Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence) mechanism

(2) CIEEL 素過程の研究における限界の1つが反応を溶液中で行うことにあったと考えた。すなわち溶液系では反応に関係する化学種、例えばラジカルイオン、と溶媒分子との相互作用が系を複雑にする。気相反応ではラジカルイオンが生成するならば、Solvent cage とは無関係に検出できると期待される。そこでわれわれは単一化学種の反応に基づく超微量種の検出が可能な質量分析装置を用いれば、不安定中間体の励起状態からの分解過程を知る手がかりとなる化学種の検出が可能と考えた。液相で観測される CIEEL 型ジオキセタン化学発光と同様に、分子内電子移動により生成する励起種を気相で検出できれば、励起分子生成機構に対し決定的な証拠を得ることができる。そこで、多くのイオン化法の中から光誘起電子移動という特性を有する MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization) 法に着目し、これを気相イオン化法・不安定種の検出に用いることにした。

(3) 高い化学発光効率を有する化合物を創出するためにも、発光機構の解明は必須である。CIEEL 型ジオキセタン化合物の化学発光では、溶媒との相互作用が反応の解析を複雑にしていると考えられるので、われわれは低圧

気相反応を扱う質量分析に注目し、励起状態にある超微量不安定種の単分子分解過程の観測を目指すことにした。先ず最初に、ジオキセタンの質量分析に関する知見を纏めると以下ようになる。

- A) 電子イオン化(EI)
- B) エレクトロスプレーイオン化(ESI)
- C) 高速電子衝撃(FAB)

(A) はハードなイオン化であり、ジオキセタン環からの酸素分子の脱離がしばしば観測される。分子イオン ($[M]^+$) を検出するためには、イオン化電圧を下げるなどの工夫が必要である。

一方、(B), (C) はソフトなイオン化であり、Positive mode でも Negative mode でも分子量関連イオンとして $\{ [M+H]^+, [M+Na]^+ \}$ あるいは $[M-H]^-$ が検出される。特に、Negative mode の FAB において CTID (charge-transfer-induced decomposition) 型ジオキセタンの $[M-H]^-$ を検出した後、CID-MS/MS の手法を用いることにより、ジオキセタン環の O-O 結合と C-C 結合の両方の開裂が起きることを大橋らが初めて報告した (Fig. 2)⁴⁾。

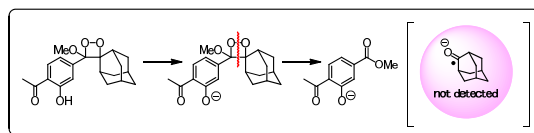


Fig. 2. Chemiluminescent reaction of dioxetanes bearing an aromatic electron donor in FAB

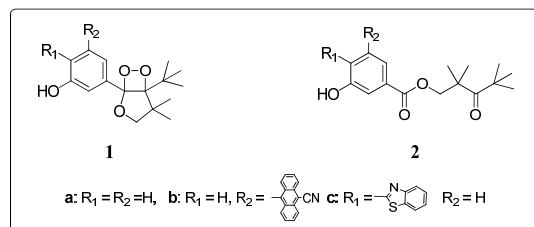


Fig. 3. Dioxetanes and related keto esters

この結果は多くの有機過酸化物の質量分析で観測される O-O 結合の均等開裂や酸素の脱離とは大きく異なる。

本研究では、多くのイオン化法の中から、新たに光の吸収によってマトリックスが励起される MALDI に着目した。MALDI 法は測定可能な質量範囲が原理的には無制限で、タンパク質・糖質・リン脂質のような生体高分子だけでなく、合成ポリマーの分析にもよく用いられる。ポリメタクリル酸メチル (PMMA) やポリエチレングリコール (PEG) 等の極性ポリマーでは $[M+H]^+$, $[M+アルカリ金属]^+$ イオンを生成しやすい。ポリスチレン (PS) のような極性官能基を持たないポリマーでは 1 価の遷移金属イオン (例えば Ag^+) の付加によりイオン化が可能である。一方、測定に必須のマトリックスに由来するクラスターイオンなどが観測されるために、

分子量 500 以下の低分子化合物の分析には MALDI は不向きとされている。しかし、電子移動素過程を調べる手法として MALDI が低分子化合物に対しても威力を発揮すると考えた。そこでわれわれは分解してもエステル側とケトン側が離れ離れにならないようなフェノール性置換基を有する双環性ジオキセタン化合物 **1a** (Fig. 3) を選び、negative-mode MALDI 条件下でのイオン化を検討した。

その結果 Soltzberg らによって報告された POT (Poly(3-octylthiophene-2,5-diyl), **11**, Fig. 4)^{5), 6)} をマトリックスとして用いると低分子量領域でも効率よくイオン化することがわかった。**11** は弱いLewis塩基として作用すると共に酸化電位の低い化合物である。

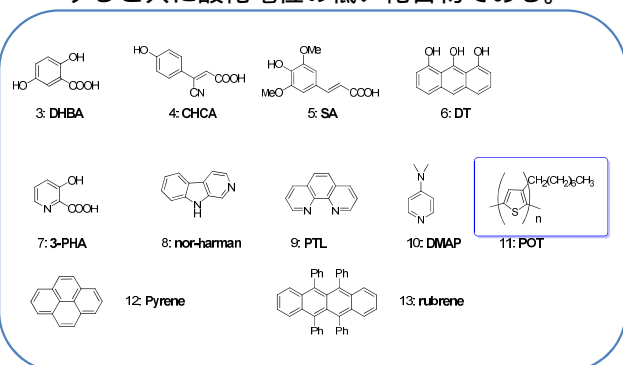


Fig. 4. Aromatic compounds used for matrices.

マトリックスとして **11** を用いると **1a** では脱プロトン化イオン ($[M-H]^-$) のみが検出された。対照的に 10-cyanoanthracene-9-yl 基を有する **1b** では $[M-H]^-$ は検出されず、ラジカルアニオン ($[M]^{-\cdot}$) のみが観測された。一方、同じ条件下で benzo [d]thiazol-2-yl 基を有する **1c** では $[M]^{-\cdot}$ と $[M-H]^-$ の両方が検出された。

次にどの位置に電子が入るかを考えなければならない。可能性としては、(a)ジオキセタン環の酸素、(b)フェノール性置換基、(c)芳香環上の置換基 (芳香環・ヘテロ芳香環) があるが、(c)の場合のみラジカルアニオン $[M]^{-\cdot}$ が検出されることから、芳香環がアンテナの役目をはたし、電子を受け取っていると考えられた。3 種類のジオキセタン化合物のイオン化様式の違いはフェノキシ基にさらに電子を容易に受け取ることができる芳香環が置換しているか否かに起因していると考えられる。即ち、シアノアントラセンやベンゾチアゾールのような芳香族性置換基は励起されたマトリックス分子から放出された電子を捕捉するアンテナの役割を果たしている。

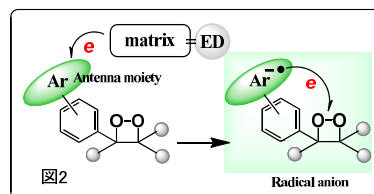


Fig. 5. MALDI (Negative-mode): Detection of radical anion $[M]^{-\cdot}$.

特に、ベンゼン環とシアノアントラセン環がほぼ直行している **1b** は、受け取った電子がシアノアントラセン環に局在化しているために $[M]^{-\cdot}$ のみが検出されたと考えている。電子の授受の際にアンテナの役割を果たす芳香環を有する **1c** の Negative-mode MS スペクトルでは分子量関連イオン $\{[M]^{-\cdot}$ (m/z 411), $[M-H]^-$ (m/z 410)} だけではなく $[M-56]^{-\cdot}$ (m/z 355) と $[M-57]^-$ (m/z 354)、 $[M-86]^{-\cdot}$ (m/z 325) と $[M-87]^-$ (m/z 324) という 2 組のフラグメントイオンも検出される。**1c** で観測されたフラグメントイオンは post-source decay (PSD) 法を用いた場合には観測されないことから in-source decay (ISD) によって生成したイオンであると考えられる。一方、ジオキセタンの構造を考えると $[M-56]^{-\cdot}$ および $[M-86]^{-\cdot}$ はラジカルアニオン $[M]^{-\cdot}$ から 2-methyl-1-propene (56u) と pivalaldehyde (86u) が脱離して生成したと推測された。しかしながら、これらのフラグメントイオンはジオキセタン骨格を残したまま直接生成するとは考えられない。一つの可能性はジオキセタンの CTID で生成するケトエステルを経由して得られるのではないかという考えである。そこで、次に標品のケトエステル **2a-2c** の同じ条件下でのイオン化を検討したところ、興味深いことに **2c** では対応するジオキセタン **1c** で観測されたフラグメントイオンは全く検出されなかった。この結果から、full-scan スペクトルでは高歪化合物であるジオキセタンからは標品のケトエステルとは異なったエネルギー状態のケトエステルが生成していることが強く示唆された⁷⁾。

2. 研究の目的

以上のように、MALDI 法質量分析を用いた予備検討で、質量分析計の中でジオキセタンの発光そのものは検出できないが、電子的励起種の Norrish type I 型分解に基づくケトン側の α -Cleavage が起こることを確認した。本研究において計画しているラジカルアニオンなどの不安定化学種の MALDI 法質量分析を用いて捕捉するためには、ジオキセタンについてのアンテナとなる芳香環の電子受容能力についてより詳細に検討を加える必要がある。本研究においては、質量分析装置内に試料が留まる時間軸において、マトリックスから電子を受け取ったジオキセタンがある程度の寿命を持ち、かつ装置内でラジカルアニオン性のカルボニルフラグメントに分

解することが検出されれば素過程の反応を見るのが可能になる。このようなジオキセタンに要求される条件は、(a)ジオキセタン O-O が直接マトリックスから電子を受け取らないことと、アンテナ部位となる芳香環が先ず効率よく電子を捕捉し、ついで O-O に電子移動が起こるようなものであること (Fig.5)、さらに (b) Norrish type I 型分解に基づくケトン側の α -Cleavage を効率良く起こすようなジオキセタンを設計することである。そこで先ず

(1). 効率良く電子を受け取るアンテナ部位を持つジオキセタンの探索

(2). Norrish type I 型の分解が起こりやすいジオキセタンの探索とラジカルラジカルアニオンの捕捉

(3). 二分子に分かれるジオキセタンにおけるラジカルアニオン種の捕捉

という観点からジオキセタンの発光分解におけるラジカルイオン種とそれに由来する不安定化学種を捕捉し、素過程の反応を検出することを目指した。さらに、その展開として

(4). 先行のジオキセタン化合物で検討した方法論と知見を基にして他の化学発光・生物発光化合物に応用することとした。

3. 研究の方法

対象サンプルを溶媒に溶かし、Matrix 溶液と混合して、MALDI 用サンプルプレートに塗布する。AXIMA-CFR, AXIMA-Performance (Shimadzu / Kratos) を用いて、N₂ Laser (337 nm) を照射しながら Reflectron-Negative mode で MS¹ スペクトルを測定した。MS/MS は AXIMA-QIT (Shimadzu / Kratos) を用いて Negative mode で同様に測定した。

4. 研究成果

(1). 初年度は効率良く電子を受け取るアンテナ部位を持つジオキセタン化合物の探索を行った。多くのジオキセタン化合物を合成し測定した。MO 計算の結果から、1 電子捕捉した時には複素芳香環に電子が貯まりやすい事が示唆されているので、ジオキセタン環に直結するフェノール性芳香環を介してアンテナとなる複素芳香環を有する分子や π 共役系を拡張し、且つ光や酸素に安定な芳香族系としてポリフェニレン環を有する化合物について検討した。母核ジオキセタン **1a** は Negative-mode MALDI 条件下ではラジカルアニオンが観測されず、脱プロトン化イオンが検出されるにすぎない。ナフタレン、フェナントレン、ベンゾフェナントレン環等芳香環数を増やしたジオキセタン **1d** ~ **1i** あるいは単結合で芳香環を拡張した **5** ~ **6** (Fig 6) を順次合成し、芳香環がアンテナ部位として働く条件を検証した結果、HOMO-LUMO energy Gap が小さいほどジオキセタンはラジカルアニオンになり易く

(Fig. 7)、マトリックスからの電子移動を経てケトン部分の α -Cleavage を引き起こすことが分かった。

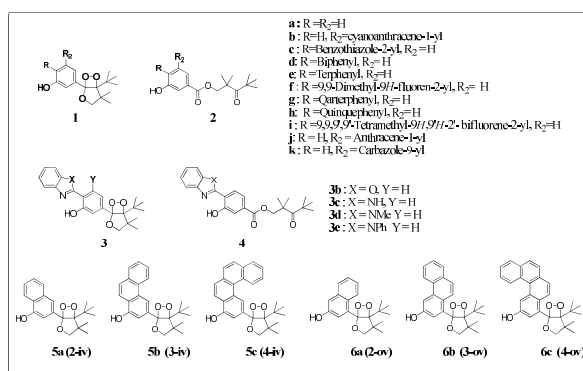


Fig. 6. Dioxetanes bearing an aromatic electron donor and related keto esters.

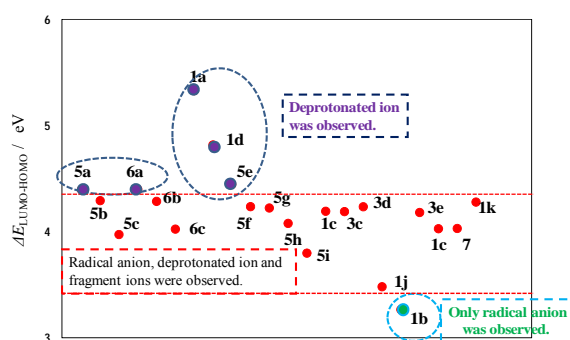


Fig. 7. $E_{\text{HOMO-LUMO}}$ gaps in dioxetanes bearing an aromatic electron donor

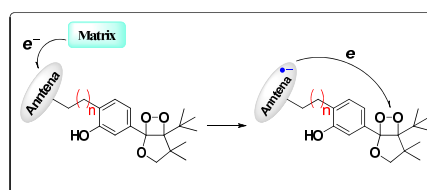


Fig. 8. Dioxetanes bearing an antenna moiety through σ -bond

また、アンテナとしての働きを見極めるために、 σ 結合を介してジオキセタン環に結合した芳香環を有するジオキセタン化合物を合成したところ、アンテナ部位を経由した分子内電子移動に誘発されたジオキセタン環が同じように分解することが分かった (Fig. 8)

(2). 縮環サイズによる分解の違い

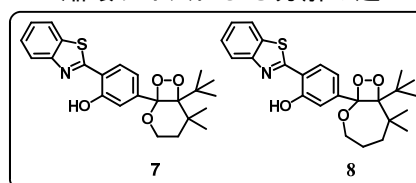


Fig. 9. Dioxetanes with annelated six- and seven-membered ring.

目的とした 7 員環化合物 (**8**) (Fig.9.) の合成

には成功しなかったが、tetrahydropyran 体 (7) も tetrahydrofuran 体 (1c) と同様に電子的励起状態を経由したケトン部位の α -cleavage を起こす。tetrahydropyran 体 (7) のほうが tetrahydrofuran 体 (1c) より効率よく pivalaldehyde (86 u) の脱離を起こす。ネオペンチル基を有するジオキセタン類の結晶状態での熱分解あるいは光分解で対応するケトエステルとともに少量の α -cleavage による生成物を確認したことから、MS スペクトルのフラグメントイオンはケトン側の電子的励起状態に基づくと考えられた。tetrahydrofuran 体の場合には ketone 部位の α -cleavage で ion-neutral complex が関与した水素移動により、pivalaldehyde (86 u) が脱離するのに対し、tetrahydropyran 誘導体 (7) ではそれ以外に γ 位からの水素移動も起こり得るために効率良く pivalaldehyde (86 u) の脱離が進行すると考えられる。(Fig.10)

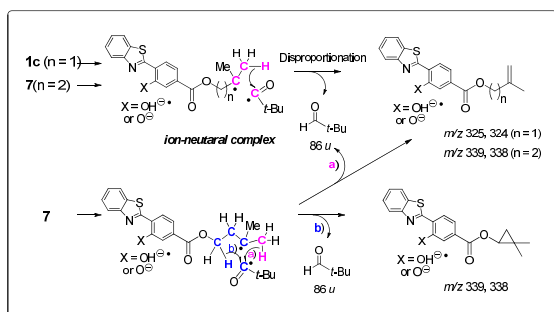


Fig. 10. Fragmentation pathways of dioxetane **1c** and **7**

(3). ベンゾチアゾール(BT)基の置換位置

2 位置置換体 (Fig. 11, **3f**) ジオキセタンの MS スペクトルでは m/z 339 に特徴的なフラグメントイオンを観測した。このような対応するケトエステル (**4f**) や、6-BT ジオキセタン・ケトエステル (**3g**, **4g**) では観測されない。BT 基の窒素原子からジオキセタン環の O-O への求核攻撃に基づくと考えられる (Fig. 12)。

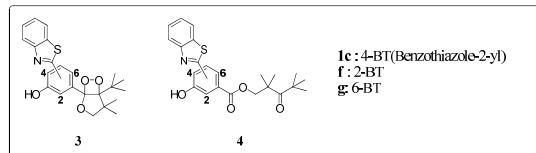


Fig.11. Dioxetanes and related keto esters bearing a 3-hydroxyphenyl moiety substituted with a benzothiazole-2-yl group at 2-(**3f**), 4-(**1c**), 6-position(**3g**).

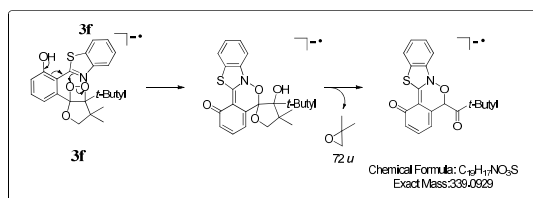


Fig.12. Fragmentation pathway of dioxetane **3f**

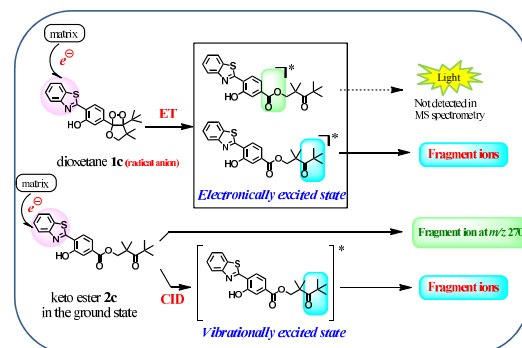


Fig. 13. The plausible fragmentation pathways of dioxetane **1c** and keto ester **2c**

以上を纏めると、ジオキセタン (**1c**) では分子内 CTID が起こって電子的に励起されたケトエステルが生成し、MS¹ においてケトン側で α -cleavage を起こす。一方、authentic keto ester ではフラグメントイオンが検出されず、CID-MS/MS の条件下で Collision エネルギーを得て振動励起状態を生成し、ケトン部位で α -cleavage を起こすことが明らかになった (Fig. 13)。即ち励起状態からの素過程の反応を見ることができた。その他にも tetrahydrofuran 体 (**1c**) だけでなく対応する ketoimide 体でも oxy-analog と同様のケトン側の励起状態から分解が観測された。

また、新たに低分子化合物に使用可能な Matrix の探索も併せて行い、Dihexylquinacridinedione (**9**) が Negative-mode 用の Matrix として使用できること、Phenazine のような含窒素多環芳香族炭化水素を添加すると S/N 比が向上し、Binary matrix (Fig.14) として使用できることがわかった。

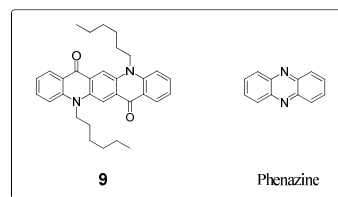


Fig. 14 Structure of binary matrix **9**

ジオキセタン化合物に関しては、ほぼ当初計画した通りに進行したが、分解してケトエステルではなく、二つのカルボニル基に分かれるような化合物の合成に成功しておらず、本法を適用することはできなかった。

また、ジオキセタン以外の化学発光物質への応用として、CIEEL 機構で発光すると言われている過シュウ酸エステル (POCT) への適用を検討した (Fig. 15)。この場合は ACT に用いる芳香族化合物が MALDI 法のマトリックスとしても使用可能である (Fig. 4, **12**, **13**)。一方で、過酸化水素あるいは過酸化水素等価体 (UHP) を用いて反応混合物を測定したが、Trichlorophenol と ACT のラジカルイ

オンを検出しただけで、その他励起状態に関する知見はまだ得られていない。

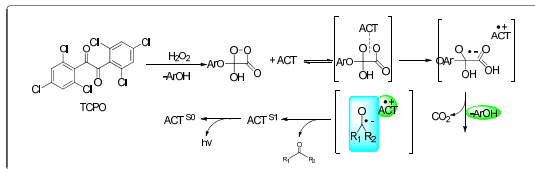


Fig. 15 CIEEL Process of peroxyoxalate chemiluminescence

< 引用文献 >

- . G. B. Shuster, *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 366-373.
- . M. Matsumoto *J. Photochem. Photobiol. C* **2004**, *5*: 27-53.
- . M. Matsumoto and N. Watanabe *Bull. Chem. Soc. Jpn. Accounts.* **2005**, *78*: 1899-1920.
- . W. Adam, M. Matsumoto, A. V. Trofimov, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 8631-8634 (2000).
4. M. Ohashi, M. Takanashi, N. Watanabe, M. Matsumoto, T. Saisu and H. Niwa., *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2001**, *7*, 441-445.
- . L. J. Soltzberg and P. Patel. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*: 1455-1458.
- . H. K. Ijuin, M. Yamada, M. Ohashi, N. Watanabe, and M. Matsumoto, *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2008**, *17*, 17-25.
- . H. K. Ijuin, M. Yamada, M. Ohashi, M. Tanimura, N. Watanabe, and M. Matsumoto. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2715-2722.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

- . Nobuko Watanabe, Hikaru Takatsuka, Hisako K. Ijuin, Ayu Wakatsuki, Masakatsu Matsumoto. *Tetrahedron Letters*, **2016**, *57*, 2558-2562. 査読 DOI:org/10.1016/j.tetlet.2016.05.004,
- . Youhei Koyama, Nobuko Watanabe, Hisako K. Ijuin, Masakatsu Matsumoto *Heterocycles*, **2015**, *90*, 462-481. 査読有 DOI: 10.3987/COM-14-S(K)43,
- . Nobuko Watanabe, Azusa Oguri, Miho Horikoshi, Hikaru Takatsuka, Hisako K. Ijuin, Masakatsu Matsumoto *Tetrahedron Letters*, **2014**, *55*, 1644-1647. 査読有 DOI:org/10.1016/j.tetlet.2014.01.089.
- . H. Kawashima, N. Watanabe, H. K. Ijuin, M. Matsumoto. *Luminescence*, **2013**; *28*: 696-704. 査読有 DOI:10.1002/bio.2419.
- . H. Hagiwara, N. Watanabe, H. K. Ijuin, M. Yamada, M. Matsumoto. *Heterocycles*, **2013**, *87*, 65-78. 査読有 DOI: 10.3987/COM-12-12602.

[学会発表](計4件)

. 伊集院久子、大橋守、大脇福喜子、渡邊信子、松本正勝
第 61 回質量分析総合討論会 2013 年 9 月 10-12 日つくば国際会議場(茨城県つくば市)

. 入江 花風・渡辺 信子・伊集院 久子・山口和夫・松本 正勝

2013 年光化学討論会 2013 年 9 月 11 日 - 13 日

愛媛大学 城北地区(愛媛県松山市)

. 伊集院久子・重田紗季江・品田麻美・中島愛乃・渡邊信子・浅見崇比呂・松本正勝

生物発光化学発光研究会第 30 回学術講演会 2013 年 11 月 2 日 東京工業大学蔵前会館(東京都目黒区)

. 伊集院久子・渡邊信子・浅見崇比呂・松本正勝

生物発光化学発光研究会第 31 回学術講演会 2014 年 11 月 1 日 信州大学繊維学部講堂(長野県上田市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊集院 久子 (Hisako Ijuin)

神奈川大学 光機能性材料研究所 プロジェクト研究員

研究者番号: 60398948

(2) 研究分担者

松本正勝 (Masakatsu Matsumoto)

神奈川大学 光機能性材料研究所 プロジェクト研究員

研究者番号: 10260986