

## 技術紹介

酸素同位体 ( $^{18}\text{O}$ ) 標識化合物の質量分析用内部標準物質としての有効性 $^{18}\text{O}$  labeled compounds as a valuable internal standard for mass spectrometry

下平 晴記\*

HARUKI Shimodaira

## 1. はじめに

安定同位体標識化合物は、創薬における薬物動態や代謝経路解析、食品中の微量残留農薬の精密な定量等の質量分析用内部標準物質（以下、内部標準）として、薬学・医学他様々な研究分野で広く利用されている。一般に、有機物の質量分析では、前処理工程による回収率のばらつきやマトリックス効果などで誤差が生じるため、正確な定量分析を行うことは難しかった。一方、測定対象物と質量のみが異なる「安定同位体標識された内部標準」を測定試料に添加することで、精密な定量分析を迅速かつ容易に行うことができる。

我々は、酸素同位体 ( $^{18}\text{O}$ ) 標識化合物（以下、 $^{18}\text{O}$  標識化合物）が、内部標準として多くのメリットを持つこと、並びに国内唯一の  $^{18}\text{O}$  メーカー (Fig.1) という利点に着目し、以下の開発に着手した。



Fig.1 Oxygen-18 separation unit (left) and Water- $^{18}\text{O}$  ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ )<sup>1)</sup> (right)

本稿では、Water- $^{18}\text{O}$  を原料にした  $^{18}\text{O}$  標識化合物の開発例と、 $^{18}\text{O}$  標識化合物の内部標準物質としての有効性の検証結果につき報告する。

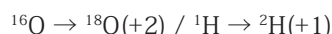
2.  $^{18}\text{O}$  標識化合物がもつ内部標準物質としてのメリット

内部標準物質として、 $^{18}\text{O}$  標識化合物を用いることは、以下の点において、大変有用である。

a) 酸素は殆どの医薬品や代謝物の構成元素として存

在し、炭素、水素の次に多い。

b) 酸素同位体 ( $^{18}\text{O}$ ) は、一標識あたりの質量増加が +2 であり、重水素 2 個分の利点がある。



c) 重水素や他の同位体と、 $^{18}\text{O}$  の併用標識が可能である。

d) 水素数が少ない測定対象化合物への選択肢となる。

e) 炭素同位体 ( $^{13}\text{C}$ ) や窒素同位体 ( $^{15}\text{N}$ ) より安価である。

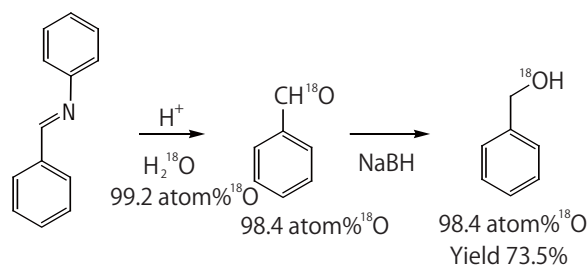
3.  $^{18}\text{O}$  標識化合物の開発

$^{18}\text{O}$  標識方法としては、 $^{18}\text{O}$  濃縮水中で酸または塩基による pH コントロールを行い、 $^{16}\text{O}$ - $^{18}\text{O}$  交換させる反応が一般的である<sup>2)</sup>。しかし、この方法は、利用できる反応対象が限定的であり、また大過剰の  $^{18}\text{O}$  濃縮水が必要なためコスト的なデメリットがある。

我々は、 $^{18}\text{O}$  転移試薬としてベンジルアルコール- $^{18}\text{O}$  を開発し、それをを用いることにより  $^{18}\text{O}$  標識率を殆ど低下させることなく、効率的に目的化合物へ  $^{18}\text{O}$  を導入させる合成技術を開発した<sup>3)</sup>。

3.1 ベンジルアルコール- $^{18}\text{O}$  の合成法

ベンジルアルコール- $^{18}\text{O}$  の合成は、以下のように行った。まず、ベンジリデンアニリンに Water- $^{18}\text{O}$  (99.2 atom%  $^{18}\text{O}$ ) を当量反応させることにより、ベンズアルデヒド- $^{18}\text{O}$  を合成した。一般的にアルデヒドは、酸性状態で容易に  $^{16}\text{O}$ - $^{18}\text{O}$  交換を起こしてしまうため<sup>4)</sup>、反応に使う酸は軽水を含んでいないものを選択することが重要である。また反応後は、できる限り空気との接触を防ぎ、還元反応を行うことで、ほぼ  $^{18}\text{O}$  濃縮度を希釈することなく、ベンジルアルコール- $^{18}\text{O}$  (98.4 atom%  $^{18}\text{O}$ ) を合成した (Scheme.1)。



Scheme.1 Synthesis of benzyl alcohol- $^{18}\text{O}$

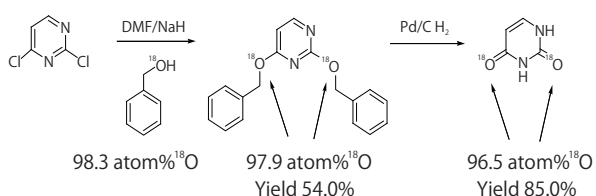
\* 開発・エンジニアリング本部 つくば研究所 SI 開発部

### 3.2 $^{18}\text{O}$ 転移試薬としてのベンジルアルコール- $^{18}\text{O}$ の利用

ベンジル基は、酸や還元反応を用いて簡単に外す事ができる手軽な保護基として、一般に知られている。

この特性を利用して、一旦、目的化合物の前駆体とベンジルアルコール- $^{18}\text{O}$ を反応させたのち、ベンジル基のみを水素添加反応で脱離させることで、目的化合物へ $^{18}\text{O}$ を導入させることが可能となる。また、ベンジルアルコール- $^{18}\text{O}$ はハロゲンや不飽和結合部位へ容易に反応できるので、様々な化合物に対し汎用的な利用が期待できる。

実際に、リボ核酸の塩基のひとつであるウラシル- $^{18}\text{O}_2$ の合成に応用したところ、97.9 atom% $^{18}\text{O}$ の高濃縮度品を得ることに成功した (Scheme.2)。



Scheme.2 Synthesis of uracil- $^{18}\text{O}_2$  using benzyl alcohol- $^{18}\text{O}$

### 4. $^{18}\text{O}$ 標識化合物の内部標準物質としての有効性

内部標準物質の理想的な条件としては、質量が異なるだけで、ほぼ同じ化学的物性的物性をもつことである。つまり (1) 精製工程で同じ挙動を示すこと、(2) ガスクロマトグラムや液体クロマトグラムでは同一保有時間を有し質量分析で異なるピークを示すこと、が重要である。

$^{18}\text{O}$  標識化合物が上記条件を満たし、内部標準物質として利用可能かを検証する為、2,4-ジベンジルオキシピリミジン- $^{18}\text{O}_2$ を対象に分析を行った。具体的には、 $^{18}\text{O}$  標識化合物と非標識化合物を 5 : 2 で混合し

たサンプルを調整し、ガスクロマトグラム質量分析計に導入した。

その結果、ガスクロマトグラムでは同一保有時間 (26.25 分) を示し、質量分析においては混合比率 (5 : 2) を、ほぼ反映した強度比 (100 : 40) をもつ質量差 4 の分子イオンピーク ( $m/z=292,296$ ) を確認した (Fig. 2)。これは、内部標準物質として $^{18}\text{O}$  標識化合物が利用できることを示す結果である。

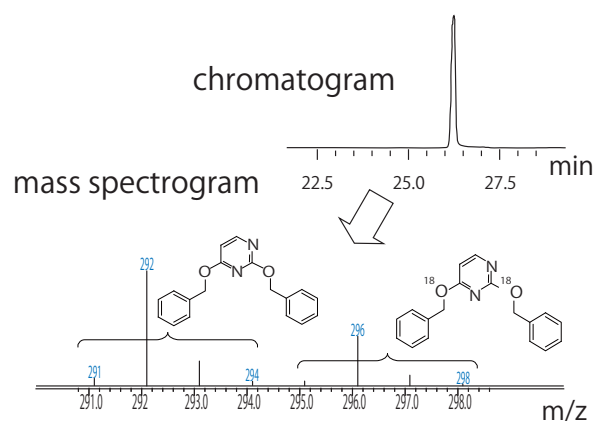


Fig.2 Chromatogram and mass spectrum of  $^{18}\text{O}$  labeled and non- $^{18}\text{O}$  labeled compounds.

### 3. まとめ

以上の結果から、本研究において開発した $^{18}\text{O}$  標識技術が有効であると共に、得られた $^{18}\text{O}$  標識化合物が、薬物動態や代謝経路解析、微量残留農薬定量等の内部標準物質として使用可能であることを検証できた。

### 参考文献

- 1) 前田彰彦 . 大陽日酸技報 . 2004, (23), p97
- 2) 独立行政法人理化学研究所 . 酸素同位体による標識方法 . 特開2006-08666
- 3) 大陽日酸株式会社 . 酸素同位体標識試薬 . 特願2009-205306
- 4) 麻生芳郎 . 安定同位体のライフサイエンスへの応用 . 講談社 , 1981, 478p.