

同位体トレーサー研究への同位体分離法の応用

世良 庄司、池田 晴美、五郎丸 毅

Application of isotopic fractionation for tracer study

Shoji SERA, Harumi IKEDA and Tsuyoshi GOROMARU

ABSTRACT

Isotope effect on retention time has been found in gas chromatography and high-performance liquid chromatography. In the case of deuterium or tritium labeled compound, the difference was sufficient to induce complete fractionation between unlabeled- and labeled-forms in particular condition. In this review, we show the isotope effect on chromatography and the application of isotopic fractionation for tracer study.

1. はじめに

同位体で標識した化合物をトレーサーとして使用する場合、「標識体と非標識体は物理化学的に同一の性質を持ち同じ挙動をとるので、特異的に検出できる標識体を追跡することで非標識体を追跡することに代えることができる」というのが同位体トレーサー法の前提となっている。しかし、標識することで化合物の物理化学的性質がわずかに変化することが知られている。この変化は一般に極めて小さく表面に現れることはまれであるが、時には観測できる程度に大きくなる場合がある。例えば、水素に比べて質量が2倍となる重水素の標識体の場合、重水の凝固点 3.81°C 、沸点 101.42°C は普通の水に比べてかなりの差である。また水と重水では熱伝導度に相違があり、これを利用した差動熱伝導度法が重水素の元素分析に現在利用されている。

放射性同位体トレーサー法では放射能のみを指標とするため非標識体との物理化学的相違が検出されることは希であるが、安定同位体トレーサー法では標識体と非標識体との割合を測定するため、両者の相違が認められる機会が多い。特に高分離能を有するガスクロ

マトグラフィー (GC) や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が試料の検出や精製に用いられるようになり、またこれらの分離能が向上するに従い、従来は全く問題とされなかった僅かな性質の相違が明らかな変化として観測される機会が多くなっている。極端な場合は標識体と非標識体とをGCやHPLCで分離検出が可能な場合がある。標識体の異常な挙動は同位体効果と呼ばれるがこれには反応速度過程に現れる動的同位体効果¹⁾とこのような平衡過程に現れる同位体効果とがある。この総説では、クロマトグラフィーにおける平衡過程の同位体効果について紹介し、同位体トレーサーの分離測定への応用について我々の研究室で得られた知見も含めて述べる。なお、以下の文中では特に標識数に触れない場合には重水素標識体をD体、³H標識体をT体、非標識体をH体と呼ぶことにする。

2. GCにおける同位体効果

GCにおける標識体の挙動の異常が認められた最も古い報告はシクロヘキサンの全ての水素を重水素標識した²H₁₂体についてである²⁾。4 mの理論段数2400段のカラムによりシクロヘキサンとそのD体は明らかに分離し、その時の保持容量の比 (H/D) は1.08とD体の方がH体より2分ほど早く流出することが認められている。また蒸気圧の比 (H/D) は1/1.08と保持容量の比と逆の関係にあり、GCにおける挙動の相違は蒸気圧の相違によるものと考えられる。D体に比べて質量の大きなT体ではさらに大きな相違を示すと思われるが、³H₃体で保持容量の比 (H/T) は1.05と標識1原子当たりの効果は³Hの方が²Hより2倍以上大きい。

GCのカラムに充填カラムより分離能に優れた中空のキャピラリーカラムが利用されるようになると著しい同位体効果が見られるようになる。15mのキャピラリーカラム、理論段数50,000段のものを用いてβ-グルコースとその²H₇体をTMS誘導体として測定した例では分離係数1.16と完全に2つのピークとして分離されている³⁾。他の糖、マンノース、リボース、キシロース、フルクトース、ラムノースについてもそれらの²H₇体との分離が僅かではあるが認められ、すべての場合でH体よりもD体が早く流出している。しかし、これら糖類とその²H₇体とを完全分離するには200,000段以上のカラムを用いる必要がある。

所で、安定同位体の測定にガスクロマト質量分析計 (GC-MS) が利用できるようになると、重水素標識体は標識合成の容易さや価格の点からトレーサーとしてまた内部標準として盛んに利用されるようになった。GC-MSではその質量によりH体とD体とを区別して測定するが、一般の充填カラムを用いているにもかかわらずH体の流出とD体の流出が一致しないことがよく経験された。一例としてフェニルブタゾンとその²H₁₀体の検出例をFig. 1に示す。保持時間が2分と極めて早い条件にもかかわらずH体とD体のピー

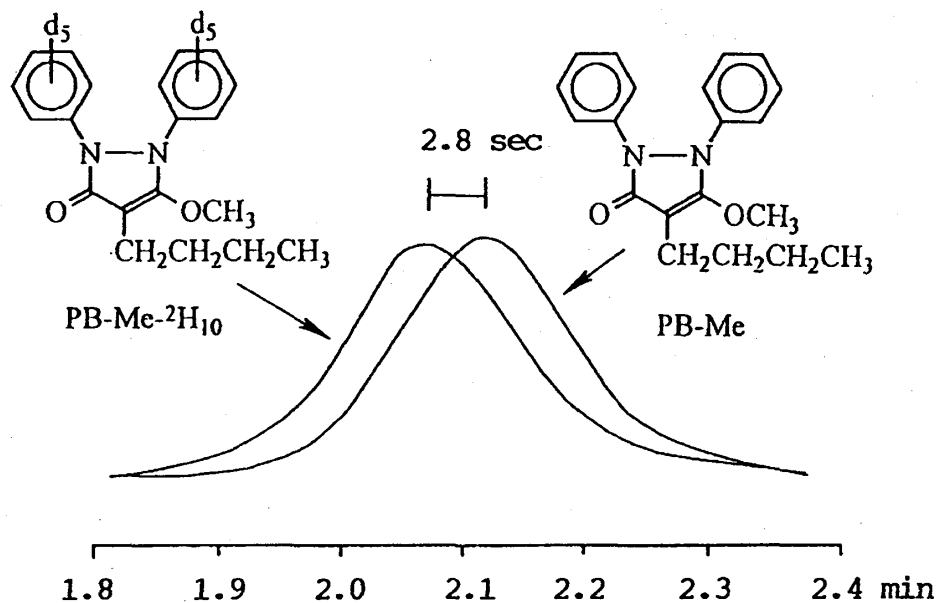


Fig.1 Selected ion monitoring of an equimolar mixture of phenylbutazone methyl derivative (PB-Me, monitoring at m/z 322) and deuterated phenylbutazone methyl derivative (PB-Me-²H₁₀, monitoring at m/z 332).

GC conditions: 1.5% OV-17, 1m×3mm, operated at 270°C

クには2.8秒の相違が認められる。GC-MS測定では他の化合物の場合も常に僅かではあるがD体の流出がH体より早いことを経験しており、GCにおける同位体効果は特殊な現象ではなく広く重水素標識体に共通する現象であると思われる。

GC-MSで2mの充填カラムにより重水素標識体を完全分離した報告がある⁴⁾。グルコースを重水素標識TMS試薬で誘導体化し完全TMS化グルコース-²H₄₅としてグルコースのTMS誘導体との分離をみたところD体のピークが34分、H体のピークが38分に出現し分離係数1.14とほぼ完全な分離が得られている。このように分子中に極めて多数の重水素を導入すればH体との分離も不可能でないことが示された。重水素標識アミノ酸についてそのTMS誘導体を3.6m充填カラムで分離を試みた報告がある⁵⁾。グリシン-²H₂、アラニン-²H₄、バリン-²H₈、フェニルアラニン-²H₈、ロイシン-²H₁₀、イソロイシン-²H₁₀についてそれらのH体との分離を測定した所、いずれも分離係数は1.04以下でピーク幅が増加するか僅かにピークの一部が分離されるにすぎなかった。ただし重水素標識数に比例してH体とD体の保持時間の差が大きくなることが認められた。

²H体に比べて³H標識体の影響の方が大きいことは既にシクロヘキサンの例で明かであるが、同じくシクロヘキサンについて³H₆体との充填カラムによる測定例がある⁶⁾。流出物の放射能と物質量の両方を指標に測定したところ、両者のピークは一致せず、物質

ピークよりも放射能ピークが早く観測された。これはH体に比べてT体の流出が早いことを示している。 ^{14}C 標識トルエンについては放射能と物質量とのピークは完全に一致し同位体効果は認められず、また ^{14}C 標識パルミチン酸メチルについて12mのキャピラリーカラムにより同位体効果を検討した例では、わずかに保持時間に相違が認められるもののその差は極めて小さい⁷⁾。一般に同位体効果は質量差の大きな水素の同位体では大きい、炭素や酸素の同位体ではほとんど認められない程度である。GCにおける同位体効果も同様に ^2H や ^3H 標識体でのみ認められ、分子内の標識数に比例して大きくなる。

3. GCによる同位体分離測定

同位体効果とは同位体によって生じる物理的あるいは化学的に差のある現象を指す言葉であるが、キャピラリーカラムに高分離能で耐久性に優れた化学結合型カラムが市販されるようになると、このGCにおける同位体効果を積極的に利用して同位体を人為的に分離する手段に利用しようとする同位体分離を目指した研究が行われるようになった。1983年バルプロ酸の同位体分離法による血漿中濃度の測定法が報告されている⁸⁾。バルプロ酸とその重水素標識体($^2\text{H}_2$ 、 $^2\text{H}_4$ 、 $^2\text{H}_6$ 体)を60mキャピラリーカラムを用いて分離した所、H体と各D体とは標識数に比例して良好に分離し、ピーク面積比の再現性も良好であった。また犬投与実験により血漿中のバルプロ酸濃度をD体を内部標準とする同位体希釈分析法で測定できることを認め、同位体希釈分析にキャピラリーGCが有効であることが証明された。

安定同位体を内部標準に利用する同位体希釈分析は試料調製時の抽出、濃縮、誘導体化時の誤差や測定時の検出感度の変動の影響を受けず再現性に優れた方法であるが、安定同位体を利用する場合この実施には質量分析計が必要であり、高価で複雑な装置を使用しなければならないことが利用の拡大を妨げてきた。このキャピラリーGCによる同位体分離法により同位体希釈分析が容易に行える道が開けたのである。更に殺虫剤エチレンジブromaidについてもその $^2\text{H}_4$ 体と50mキャピラリーカラムにより良好な分離が可能で、ヘッドスペース法でECD検出により高感度な同位体希釈分析が可能であった⁹⁾。

我々の研究室においても容易に実施できる同位体希釈分析法としてこのキャピラリーGCによる同位体分離法に興味を覚え当時研究中であったイプロニアジドの肝障害の研究に応用することにした。イプロニアジド(IPN)とその代謝物イソプロピルヒドラジン(IP-Hy)について各 $^2\text{H}_6$ 標識体との分離を50mカラムにより検討した^{10, 11)}。Fig. 2にIPNとその $^2\text{H}_6$ 体の分離を、Fig. 3にIP-Hyとその $^2\text{H}_6$ 体を誘導体IDP及びIDP- $^2\text{H}_6$ とした時の分離を示す。分離係数はIPNで1.10、IDPでは1.62と良好な分離を示し、またピーク比の再現性は良好であった。IPN投与ラットについてIPN及びIP-Hyの血漿中及び尿中濃度を同位体希釈分析により求めGC-MSでの測定

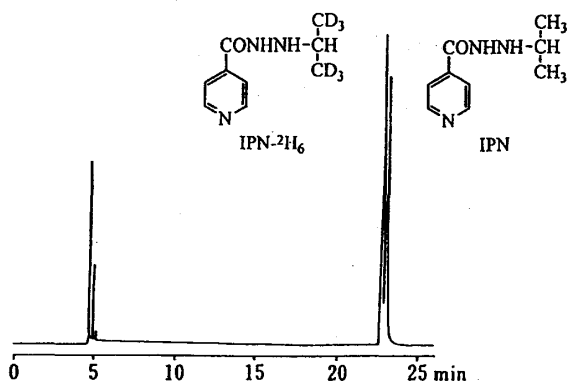


Fig.2 Gas chromatographic separation of iproniazid (IPN) and deuterated iproniazid (IPN- $^2\text{H}_6$).

GC conditions: CBP1-M50-025, 50m, operated at 155°C

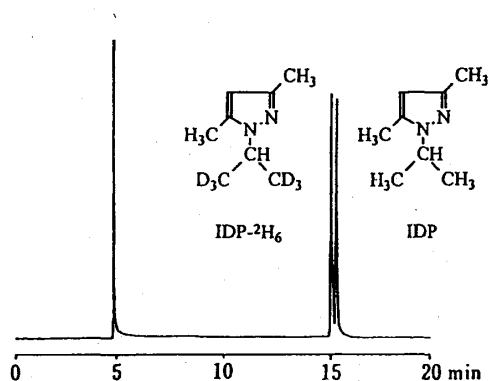


Fig.3 Gas chromatographic separation of isopropylhydrazine derivative (IDP) and deuterated isopropylhydrazine derivative (IDP- $^2\text{H}_6$).

GC conditions: CBP1-M50-025, 50m, operated at 90°C

結果と比較した所、IP-Hyでは良く一致し、IPNではGC-MS測定に比べて信頼性の高い結果が得られた。GC-MS測定に比べて操作は簡単で装置の信頼性も高くルーチン測定に適した方法であると判断される。

リジンの代謝物であるピペコール酸の血漿、尿、脊髄液中の濃度を $^2\text{H}_9$ 体を内部標準に測定した報告がある¹²⁾。ピペコール酸を含フッ素誘導体とし25mカラムで分離後ECD検出し同位体分離測定を行っている。GCによるこの方法は従来実施されてきたGC-MS法に感度及び精度ともに匹敵する方法であり、患者におけるピペコール酸濃度の測定に十分実用性のあることが認められた。

当研究室でも次にアミノピリン (AM) の同位体分離を検討した¹³⁾。AM- $^2\text{H}_6$ 及びAM- $^2\text{H}_9$ とAMとの25mカラムにおける同位体分離はFig. 4のように標識数の大きな $^2\text{H}_9$ とAMではほぼ完全な分離が得られ分離係数1.52、 $^2\text{H}_6$ とでは1.05と不十分な分離を示した。これらの分離に及ぼすカラム温度の影響を検討した所、カラム温度の絶対温度の逆数 ($1/T$) と保持時間のH体 (t_H) とD体 (t_D) との相対的な差 α ($(t_H - t_D)/t_H$) を分離指標に用いると両者の間にはFig. 5 に示す相関関係が認められた。同一カラム温度では標識数が多いほど高分離が得られ、また $^2\text{H}_6$ 体でもカラム温度を下げれば分離性は向上する。ただし温度を下げた場合、測定に要する時間は長くなり、またピーク幅が広がることによりピーク高さは減少しその結果感度の低下は避けられない。

同位体分離における重水素標識の影響で、分離が標識数に依存することはいくつかの報告でも触れられているが、詳細を検討するため種々の位置を重水素で多重標識したイソプロピルアンチピリン (IPA) を合成し、分離に対する標識数及び標識位置の影響を検討

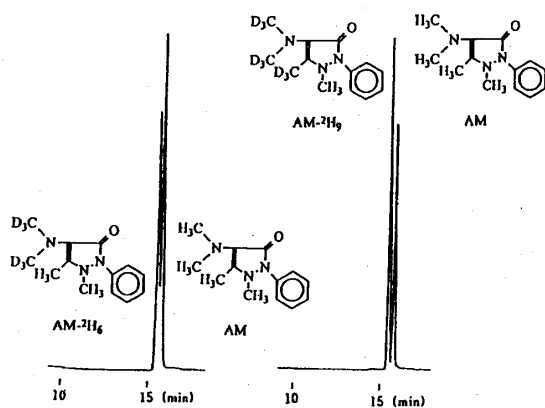


Fig.4 Gas chromatographic separation of aminopyrine (AM) and Deuterated aminopyrines (AM-²H₆ and AM-²H₉).

GC conditions: CBP1-M25-025, 25m, operated at 180°C

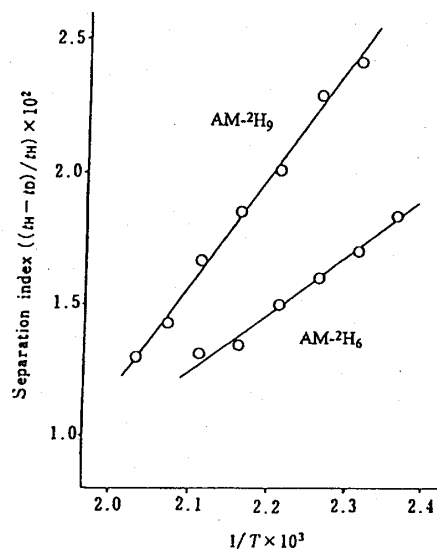
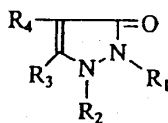


Fig.5 Effect of column temperature on separation of protio- and deuterio-aminopyrines.

した¹⁴⁾。合成したIPAの重水素標識体をTable 1に示すが、最大9個の重水素を分子内に導入した。標識数と分離指標 α との関係はFig. 6に示すように相関が認められるが、標識位置による影響もうかがえる。例えば2位メチルの標識体 (IPA-²H-2) と3位メチルの標識体 (IPA-²H-3) では重水素標識数はどちらも3個であるが、 α 値には約2倍の相違がある。また標識重水素1個当たりの影響ではフェニル基への標識はメチル基やイソプロピル基への標識に比べて小さい。さらに複数位置を標識した場合にはその影響は個々の標識による影響の和となり、 α 値に相加性が認められる。

Table 1. Structure and deuterium contents of deuterated isopropylantipyrines



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Number of labeled atoms	Atom%D
IPA	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	0	0
IPA- ² H-1	C ₆ D ₅	CH ₃	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	5	97.5
IPA- ² H-2	C ₆ H ₅	CD ₃	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	3	99.6
IPA- ² H-3	C ₆ H ₅	CH ₃	CD ₃	CH(CH ₃) ₂	3	96.4
IPA- ² H-4	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH(CD ₃) ₂	6	83.6
IPA- ² H-5	C ₆ D ₅	CH ₃	CD ₃	CH(CH ₃) ₂	8	97.4
IPA- ² H-6	C ₆ H ₅	CD ₃	CD ₃	CH(CH ₃) ₂	6	99.4
IPA- ² H-7	C ₆ H ₅	CH ₃	CD ₃	CH(CD ₃) ₂	9	88.2

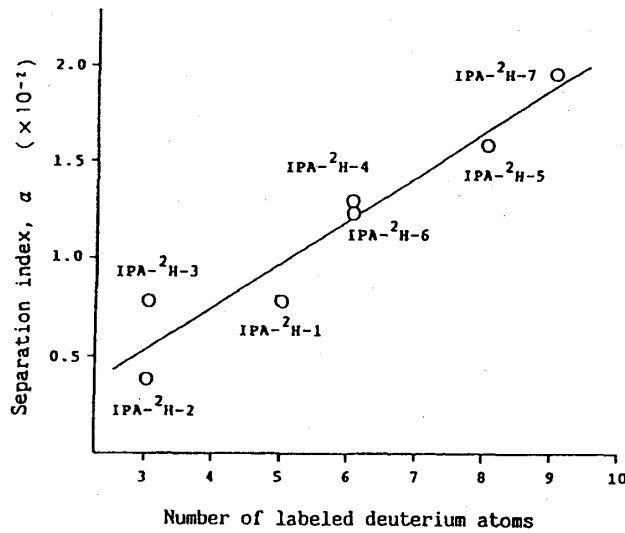


Fig.6 Effect of labeled deuterium atoms on the separation of various deuterated analogues from isopropylantipyrine.

Table 2. Deuterium contents and peak width of IPA-²H-3

Compound	Exchange medium		Deuterated species (%)				Deuterium contents (atom%D)	Peak width (min)
	² H ₂ O+H ₂ O		² H ₀	² H ₁	² H ₂	² H ₃		
IPA	0%	100%	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.38
IPA- ² H _a	20%	80%	75.0	21.8	3.2	0.0	9.3	0.48
IPA- ² H _b	40%	60%	54.0	33.1	11.9	1.9	21.3	0.52
IPA- ² H _c	60%	40%	19.7	36.2	33.6	10.8	45.2	0.56
IPA- ² H _d	80%	20%	19.3	25.8	31.7	23.2	53.9	0.58
IPA- ² H-3	100%	0%	0.0	0.4	10.0	89.6	96.4	0.38

重水素標識体ではGCにおいてピーク幅に広がりが見られる場合がある。IPAの場合もIPA-²H-7のピーク幅はIPAに比べて約2倍である。この現象について、分子量の増加による拡散速度の低下によるとの説もあるが納得しがたい。この点を明らかにするため、IPAの3位メチルを重水と軽水の種々の割合の溶媒を用いて交換法により標識してみた。Table 2に得られた標識体の重水素含量とピーク幅を示すが、IPAと重水素がほぼ完全に交換したIPA-²H-3のピーク幅はIPA同じであるのに、交換が不十分なものでは、²H₀体、²H₁体、²H₂体、²H₃体が混在しピーク幅も広がっている。このことは各²H₁体、²H₂体、²H₃体も相互に分離してはいないが標識重水素数に従って保持時間が短縮していることを示している。この実験で用いたカラム(50m、理論段数212,000段)の10倍の分離性能があればこれらを個々のピークとして分離検出する事が可

能と推定される。

合成麻薬性鎮痛薬フェンタニル (FT) は投与量が $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ と少なく、患者血清中濃度も ng/ml 程度である。現在、FT には簡便でルーチンに適した有効な測定法がなく患者動態について不明な点が多い。我々は既に GC-MS により FT の代謝研究を行ってきたが¹⁵⁻¹⁹⁾、GC-MS によっても血清中濃度の測定は困難であった。FT の測定の困難さの原因はその濃度が低く高感度が要求される点と試料調製段階での吸着による損失が著しい点である。このため 3 級アミンに選択的な表面電離型検出器 (SID) を用い、吸着を補正できる同位体希釈分析をキャピラリー GC による同位体分離法で実施することを計画した。この場合、吸着を補正するだけでなくキャリアー効果による吸着の防止も期待して FT に対して相対的に多くの重水素標識 FT を添加し測定することにした。

キャピラリー GC における同位体分離はカラム温度に依存することを前に述べた。FT の測定には比較的高温の 260°C が適当であり、またキャリアー効果を得る必要から FT に対してかなり量を添加しても十分な分離を示すような重水素標識数のものが要求される。そこで標識可能な部位を全て標識した $\text{FT-}^2\text{H}_{19}$ を合成し同位体分離性を検討した。FT と $\text{FT-}^2\text{H}_{19}$ とは 25m カラムで分離係数 1.71 と完全に分離し、D 体に対して 100 分の 1 までの FT を定量的に検出することが可能である。患者血清 1 ml に $^2\text{H}_{19}$ 体 20ng を添加後、抽出精製し SID 検出すると Fig. 7 に示すように血清中の FT を十分定量可能であり、測定所要時間は 15 分以内、定量限界は $0.2\text{ng}/\text{ml}$ であった²⁰⁾。FT のフェネチル基をベンジル基に、あるいはプロピオニル基をアセチル基に変換した構造類似体を内部標準に用いて同様の抽出精製を行ってみたが定量性の極めて悪い結果となり、最も忠実な内部標準といわれる D 体を用いた同位体希釈分析の特徴が発揮されている。現在、本方法により患者における FT の動態の個人差の解析を実施中である。

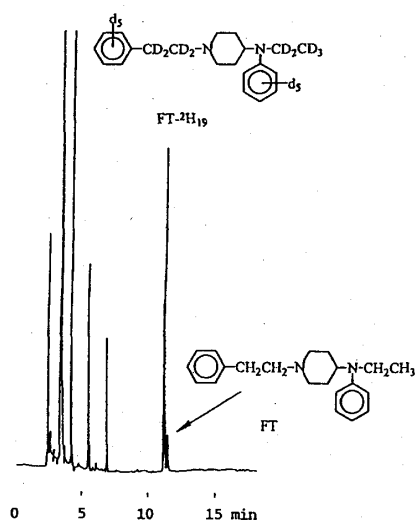


Fig.7 Gas chromatogram of serum extract after I.V. administration of FT to patient.

GC conditions: CBP1-M25-025, 25m, operated at 260°C

プロポホル (PF) は現在開発中の静脈麻酔薬であるが、フェノール誘導体で気化しやすく濃縮操作等により損失が起こる問題点がある。この点を解決するには同位体希積分が有効であり、 $^2\text{H}_6$ 体及び $^2\text{H}_{12}$ 体を標識合成した。Fig. 8にHFB誘導体としてECD検出した場合のPF、 $^2\text{H}_6$ 体及び $^2\text{H}_{12}$ 体相互の分離を示すが、50mカラムによりこれら3者を高感度で分離測定することが可能である。25mカラムでも120℃でPFと $^2\text{H}_{12}$ 体は分離係数2.41と良好な分離を示し測定時間も10分程度であるが、分離性を多少犠牲にすれば測定時間を更に短縮可能である²¹⁾。さらにPFの場合には特殊な体内挙動を示すことが予想され $^2\text{H}_6$ 体投与によるトレーサー研究や、患者における投与条件の最適化への応用を計画している。

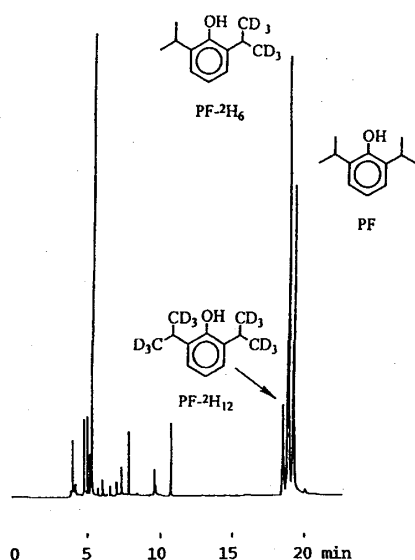


Fig.8 Gas chromatographic separation of propofol (PF) and deuterated propofols (PF- $^2\text{H}_6$ and PF- $^2\text{H}_{12}$). GC conditions: CBP5-M50-025, 50m, operated at 120℃

^3H 標識体に関する同位体分離例としては T_2 ガスについての報告がある。 T_2 ガスは最も単純な標識分子で大きな同位体効果が期待される。 H_2 ガスやHTガスとはGCにより完全に分離することが可能で、特殊な円筒状カラムを用いて実用規模での ^3H の分離と回収が試みられており、将来の核融合実験に向けての ^3H の国産化と関連して関心が持たれている²²⁾。

4. HPLCにおける同位体効果

HPLCはGCとは異なり分離した成分を回収できることから、標識合成品の精製や測定試料のclean up操作に利用されるようになってきたが、それにつれて標識体と非標識体の挙動の相違が検出される機会も増えてきた。簡単な化合物のHPLCによる同位体効果の例としてはベンゼンとその $^2\text{H}_6$ 体、トルエンとその $^2\text{H}_8$ 体を逆相系HPLCで検討した報告がある²³⁾。1m×1.2mmのODSカラムを用い H_2O -MeOH系で分離を検

討しているが、ベンゼンでは分離係数1.08、トルエンでは分離係数1.09といずれもD体の流出が早かった。GCとの比較の結果、HPLCでは低い理論段数の短いカラムでも短時間に分離できる可能性のあることが指摘された。また開発中のOrg GC 94の血漿中濃度を $^2\text{H}_4$ 体 (Fig. 9) を用いて同位体希釈分析を行うため順相系HPLCにより試料の精製を行った報告では、H体の流出が早くD体と不完全ではあるが分離されることが認められている²⁴⁾。この場合には30cm×4 mmの μ Porasilカラムを用いているが、移動相のpHにより分離性は変化し酸性条件で最も良い分離を示し、重水素標識により極性の中心である窒素原子の性質が変化することより吸着性が低下するものと推定される。

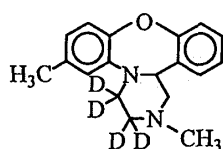
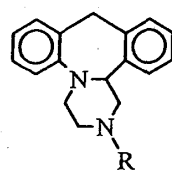
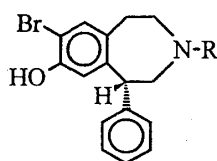


Fig.9 Structure of Org GC 94- $^2\text{H}_4$



R:CH₃ Mianserin
R:CD₃ Deuterium labeled
R:CT₃ Tritium labeled

Fig.10 Structures of mianserin and its labeled forms



R:CH₃
R:CD₃
R:CT₃

Fig.11 Structures of SK&F 83566 and its labeled forms

^3H 標識体のHPLCでの同位体効果の例としては、ミアンセリンのN-メチル基を ^2H や ^3H で標識した $^2\text{H}_3$ 体や $^3\text{H}_3$ 体 (Fig.10) との分離がある。順相系HPLCによりH体13分、D体14分、T体15分と3者が相互に分離され、これは $\text{H} < ^2\text{H} < ^3\text{H}$ の順に極性が増加するためではないかと思われる²⁵⁾。このようなN-メチル基を ^3H 標識した場合のHPLCにおける異常性はオキシモルヒネ、モルヒネ、ジヒドロモルヒネ、LSDにおいても認められる。全く同様の影響がSK&F 83566 (Fig.11) のN-メチル基を ^2H あるいは ^3H 標識した場合にも認められpHに依存した分離性の変化が起こるが、O-メチル誘導体ではN-メチル基の標識に比べて標識による影響は小さくpHの影響も認められていない²⁶⁾。イミプラミンにおいてもN原子近傍の3'位や5'位の ^3H 標識により保持時間が変化することが報告されている²⁷⁾。

高比放射能の標識化合物の放射化学的純度測定では、試料の一部に非標識体 (H体) を添加しHPLCによりH体のピークをUV検出して分取し、この中に含まれる放射能をもと

に純度を求めることが行われる。この方法ではH体と標識化合物がHPLCにおいて同一挙動をとることが前提である。ところが、プレドニゾン²⁸⁾やビタミンD²⁹⁾の³H標識体では明らかにUVピークと放射能ピークとは一致せず、逆相系では放射能ピークが早く、順相系ではUVピークの方が早く流出した。H体とT体とのこのようなHPLC挙動の相違はドーパミンおよびその代謝物DOPACの³H標識体においても認められる³⁰⁾。

¹³Cや¹⁴C標識体においてもHPLCにおける異常性が報告されている³¹⁾。15cmのODSカラムにより水-アセトニトリル系を移動相とした場合、ロイシンについて[1-¹³C]ロイシンとロイシンには有意な保持時間の相違があり、¹³C体が遅く流出した。また[3,4,5-³H]ロイシンと[1-¹⁴C]ロイシンの混合物をHPLC精製した場合、放射能の流出は一致せずピークの前半では³Hの後半では¹⁴Cの放射能が大きくなり、両標識体のHPLC挙動が等しくないことが判明した。このことは二重標識法によるRI実験において、HPLCによる精製が大きな問題を含んでいることを示すものである。

以上のように、GCに比べてHPLCでは通常分析条件においてもD体やT体の異常が観察された例が多く、標識位置により保持時間に対する影響がかなり異なるなどの特徴がある。特にアミノ化合物では標識化によりpKaに変化が生じるといわれており、これがHPLC挙動の異常性の原因の一つと思われる。

5. HPLCによる同位体分離測定

HPLCにおける標識体の同位体効果を利用してGCの場合と同様に同位体分離に利用しようとする研究がある。カルマゼピンとそのD体およびフェニトインとそのD体について測定時間がそれぞれ30分、40分と長時間を要するもののほぼ完全な分離が得られている³²⁾。また特殊なキャピラリーカラムを使用しメチルアミンとその²H₃標識体をフルオレッセインイソチオシアネートとして3mカラムを用いて95分ではほぼ完全な分離が得られている³³⁾。

我々の研究室でもGCにおいて同位体分離が認められた標識体を対象に、HPLCにおける同位体分離を検討してみると、Table 3に示すようにフェニルブタゾン、フェニトイン、イソプロピルアンチピリン及びアミノピリンは各D体と通常のカラム条件により、ほぼ完全な分離が得られることを確認した。測定には多少時間を要するものの容易に同位体分離が行え、HPLCもまた同位体希釈分析に利用可能である。GCにおいてはH体とD体との分離は標識位置よりも標識重水素数の方が大きく影響するが、HPLCにおいてはイソプロピルアンチピリンの場合、IPA-²H-7よりもIPA-²H-5の影響が大きく、フェニル基の標識が有効であった。

そこで、HPLCによる同位体分離法を利用してトレーサー実験を試みることにした。

Table.3 Isotopic fractionation of deuterated compounds on HPLC

Compound	Column (cm)	Mobile phase	Retention time(min)		Rs
			D-form	H-form	
phenylbutazone- $^2\text{H}_{10}$	15	A(40:60)	34.01	35.29	0.947
phenytoin- $^2\text{H}_{10}$	25	A(60:40)	42.96	45.40	0.946
IPA- $^2\text{H}_7$	25	B(60:40)	54.20	55.85	0.585
IPA- $^2\text{H}_5$	25	B(60:40)	55.48	57.55	0.857
aminopyrine- $^2\text{H}_9$	25	C(75:25)	68.97	72.15	1.087

HPLC conditions: ODS-80T_M, 0.1% H_3PO_4 :MeOH(A), H_2O :MeOH(B),
10mM K_2PO_4 :MeOH(C)

従来、肝のグリシン抱合能の評価法として安息香酸 (BA) から馬尿酸 (HA) への変換を尿中HA排泄速度の測定が行われている。内因性のHAの影響を除外するため安定同位体トレーサー法によりBA- $^2\text{H}_5$ 投与によるGC-MS測定³⁴⁾あるいは ^{13}C 標識BA投与によるNMR測定³⁵⁾が行われている。これら高価で操作の複雑な測定機器を用いない方法として、HPLCによるBAおよびHAとそれらの $^2\text{H}_5$ 体との同位体分離を試みた³⁶⁾。25cmのODSカラムを用い、移動相にメタノール-リン酸系を使用した所、BAとBA- $^2\text{H}_5$ の分離係数は1.22、HAとHA- $^2\text{H}_5$ の分離係数は1.05と同位体分離測定が可能であることを認めた。被験者にBA- $^2\text{H}_5$ 50mgを経口服用させ経時的に採尿し、尿中のHAを加水分解してBAとして測定した場合 (Fig.12、A) とそのままHAとして測定した場合 (Fig.12、B) のクロマトグラムを示す。HAとして測定すれば測定時間は

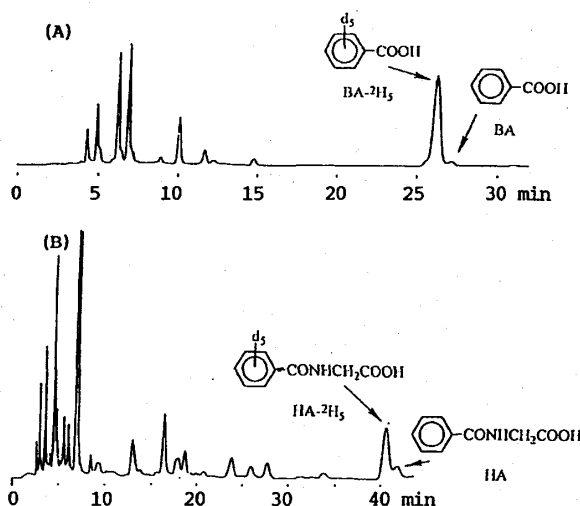


Fig.12 Liquid chromatograms of urine extract with (A) or without (B) hydrolysis after administration of benzoic acid- $^2\text{H}_5$ (BA- $^2\text{H}_5$) to man.

HPLC conditions: ODS-80T_M, 25cm×4.6mm, 0.1% H_3PO_4 -MeOH (70:30(A), 95:5(B))

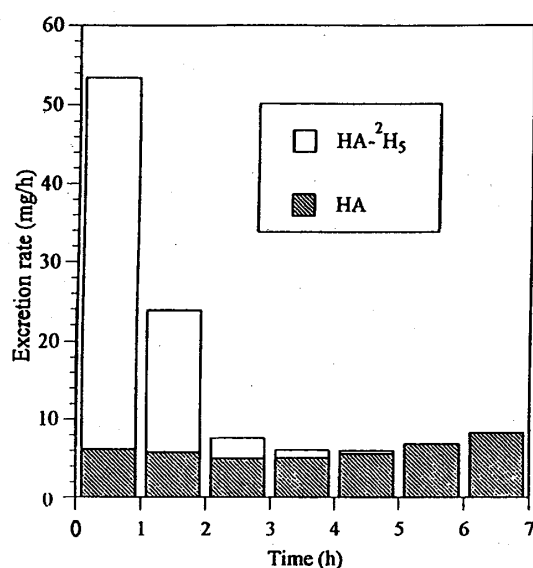


Fig.13 Excretion rate of hippuric acid (HA) and its deuterated form (HA-²H₅) after administration of benzoic acid-²H₅ in man.

長いものの加水分解処理が不要であるため、直接分析がより簡便であると思われる。同一時間尿を2分し、一方はそのまま、また一方には既知量の²Hを添加して同位体二重希釈法により内因性HAと投与物由来のHA-²H₅両方の尿中排泄速度を求めた。Fig. 13にその1例を示すが、内因性HAの排泄速度は5~8 mg/hと変動しているが、BA-²H₅由来のHA-²H₅は服用直後に50mg/hとなり、服用後3時間で服用量の90%が尿中に排泄されている。このように、HPLCによる同位体分離法は容易に実施でき臨床応用も可能な方法であることが認められた。

6. おわりに

以上のようにGC及びHPLCにおける標識体の同位体効果と同位体分離について述べたが、将来さらに高分離能カラムの一般利用が可能になれば、同位体分離に必要な標識数も一段と少なくてすみ、また測定も短時間で行えるようになると期待される。特に安定同位体の測定ではこの同位体分離法はGC-MSやNMRとは異なった特徴を有し、従来特殊な測定がネックであった臨床診断への利用の道が開けてくると思われ新しい展開が待たれる。一方、放射性同位体に関してはクロマトグラフィーにおける同位体効果は望ましいものではないが、同位体分離を利用して従来不可能とされていたキャリアーの除去による比放射能の向上も³H標識体については夢ではないと考えている。

文 献

- 1) 麻生芳郎他、安定同位体のライフサイエンスへの応用、講談社(1981)。

- 2) K.E. Wilzbach and P. Riesz, *Science*, 126, 748–749 (1957).
- 3) R. Bently, N.C. Saha and C.C. Sweely, *Anal. Chem.*, 37, 1118–1122 (1965).
- 4) G.R. Waller, S.D. Sastry and K. Kinneberg, *J. Chromatogr.*, 7, 577–578 (1969).
- 5) W.J.A. Vandenheuvel, J.L. Smith, I. Putter and J.S. Cohen, *J. Chromatogr.*, 50, 405–412 (1970).
- 6) B.E. Gordon, J.W. otvos, W.R. Erwin and R.M. Lemmon, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 33, 721–724 (1982).
- 7) M. Matucha, W. Jockisch, P. Verner and G. Anders, *J. Chromatogr.*, 588, 254–258 (1991).
- 8) D.J. Hoffman and W.R. Porter, *J. Chromatogr.*, 276, 301–309 (1983).
- 9) T. Keough, R.J. Strife, P.A. Rodriguez and R.A. Sanders, *J. Chromatogr.*, 312, 450–455 (1984).
- 10) 五郎丸毅、池尻久恵、橋本謙二、松木洋子、*薬誌*, 111, 612–616 (1991).
- 11) 五郎丸毅、*Radioisotopes*, 41, 33A (1992).
- 12) T. Zee, F. Stellaard and C. Jakobs, *J. Chromatogr.*, 574, 335–339 (1992).
- 13) 五郎丸毅、前田晴美、松木洋子、際田弘志、*Radioisotopes*, 42, 511–516 (1993).
- 14) T. Goromaru and H. Maeda, *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1635–1639 (1994).
- 15) T. Goromaru, H. Matsuura, T. Furuta, S. Baba, N. Yoshimura, T. Miyawaki and T. Sameshima, *Drug Metab. Dispos.*, 10, 542–546 (1982).
- 16) T. Goromaru, H. Matsuura, N. Yoshimura, T. Miyawaki, T. Sameshima, J. Miyao, T. Furuta and S. Baba, *Anesthesiology*, 61, 73–77 (1984).
- 17) T. Goromaru, M. Katashima, H. Matsuura and N. Yoshimura, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 3922–3928 (1985).
- 18) 五郎丸毅、川内隆史、片島正貴、松浦博、吉村 望、鮫島照子、宮脇武徳、*麻醉*, 35, 35–39 (1985).
- 19) 五郎丸毅、*日本産業科学研究所報告*, 4, 55–66 (1987).
- 20) 五郎丸毅、前田晴美、世良庄司、第31回理工学における同位元素研究発表会 (1994).
- 21) 五郎丸毅、池田晴美、世良庄司、森川直樹、第34回日本薬学会中国四国支部大会 (1995).
- 22) 棚瀬正和、*Radioisotopes*, 44, 593 (1995).
- 23) G.P. Cartoni and I. Ferretti, *J. Chromatogr.*, 122, 287–291 (1976).
- 24) J.J. De Ridder and H.J.M. Van Hal, *J. Chromatogr.*, 121, 96–99 (1976).
- 25) C.N. Filer, R. Fazio and D.G. Ahern, *J. Org. Chem.*, 46, 3344–3346 (1981).

- 26) J.R. Heys, *J. Chromatogr.*, 407, 37-47 (1987)
- 27) J.D. Unadkat and M. Rowl, *J. Chromatogr.*, 261, 298-300 (1983).
- 28) B.K. Kudelin, L.V. Gavrilina and Yu.L. Kaminski, *J. Chromatogr.*, 636, 243-247 (1993).
- 29) B.P. Halloran, D.D. Bikle and J.O. Whitney, *J. Chromatogr.*, 303, 229-233 (1984).
- 30) J.A. Vand de Krog, F.M. Valkenburg and R.D.M. Belfroid, *J. Chromatogr.*, 427, 9-17 (1988).
- 31) P. Q. Baumann, D. B. Ebenstein, B. D. O'Rourke and K. S. Nair, *J. Chromatogr.*, 573, 11-16 (1992).
- 32) T.R. Browne, *Clin. Pharmacokinet.*, 18, 423-433 (1990).
- 33) J.W. Jorgenson, D.J. Rose and R.T. Kennedy, *International Laboratory*, Nov./Dec., 12-18 (1988).
- 34) 東与光、若尾博美、馬場茂雄、堀江正信、中村功、木下寿隆、三浦溥太郎、*医学のあゆみ*, 97, 707-708 (1976).
- 35) S. Baba, K. Akira, H. Suzuki and M. Imachi, *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 643-647 (1995).
- 36) 五郎丸毅、世良庄司、池田晴美, *Radioisotopes*, 44, 693-700 (1995).