

SHIMADZU  
Excellence in Science

ERAS-0001-0010

# 安定同位体試薬の有用性 ～ワンランク上の定量分析を目指して～

株式会社島津製作所 分析計測事業部

SHIMADZU

ERAS-0001-0010

## 本日の内容

- ◆ 定量方法の基礎 ～絶対検量線法と内標準法～
- ◆ 安定同位体標識 (SIL\*) 化合物って何？  
\* SIL : Stable Isotope Labeling
- ◆ 良いSILとは？
- ◆ SILを用いた分析例

2

SHIMADZU ERAS-0001-0010

## 定量方法

絶対検量線法 … 既知濃度の標準試料を使って検量線を作成

標準試料 (成分A:100ppm)  
ピーク面積:1000

未知試料  
ピーク面積:700  
成分Aの濃度は70ppm

濃度 (ppm)

ピーク面積

メリット : 目的成分が分離検出できていれば定量が可能。  
デメリット : 注入量の誤差がそのまま定量値の誤差になる。

3

SHIMADZU ERAS-0001-0010

## 定量方法

内標準法 … 目的成分と内部標準物質のピーク面積比と濃度比を元に、目的成分の濃度を求める定量方法。

標準試料 (成分A:100ppm)  
成分A 内部標準  
ピーク面積 :1000 1000  
ピーク面積比 : 1

未知試料  
ピーク面積 : 700 1000  
ピーク面積比 : 0.7  
成分Aの濃度は70ppm

濃度比

ピーク面積比

メリット : 面積比・濃度比を用いることで注入量の誤差を補正できる  
実試料中の夾雑成分の影響を受けにくい  
→ 絶対検量線法より精度の高い定量が可能！

4

ERAS-0001-0010

SHIMADZU

## 定量方法

内標準法 …… 目的成分と内部標準物質のピーク面積比と濃度比を元に、目的成分の濃度を求める定量方法。

デメリット：

すべての未知試料に、正確な濃度となるように内部標準物質を添加する必要がある。  
内部標準物質となる条件が厳しい。

- ✓ 試料中のすべての成分とほぼ完全に分離されること
- ✓ 分析目的成分の近くに溶出すること
- ✓ 分析目的成分と化学的に類似の性質をもっていること
- ✓ 化学的に安定であること

内標準法は難しい・・・

→ 内部標準となりうる物質を見つけることが重要！

→ 質量分析法では、すべての条件を満たす安定同位体試薬が最適！

5

ERAS-0001-0010

SHIMADZU

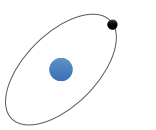
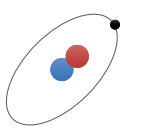
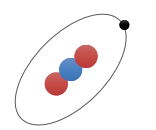

## 同位体とは

同位体・・・原子番号が同じで質量数（中性子の数）が異なる原子

● 陽子

● 中性子

● 電子

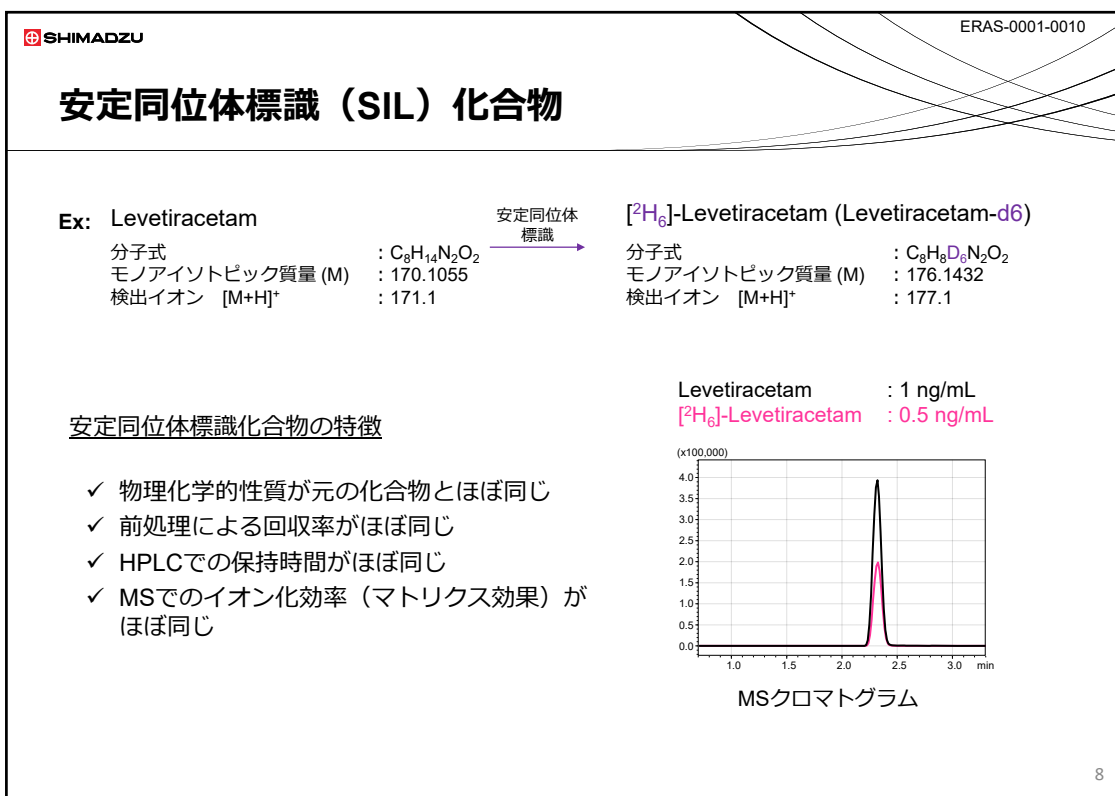
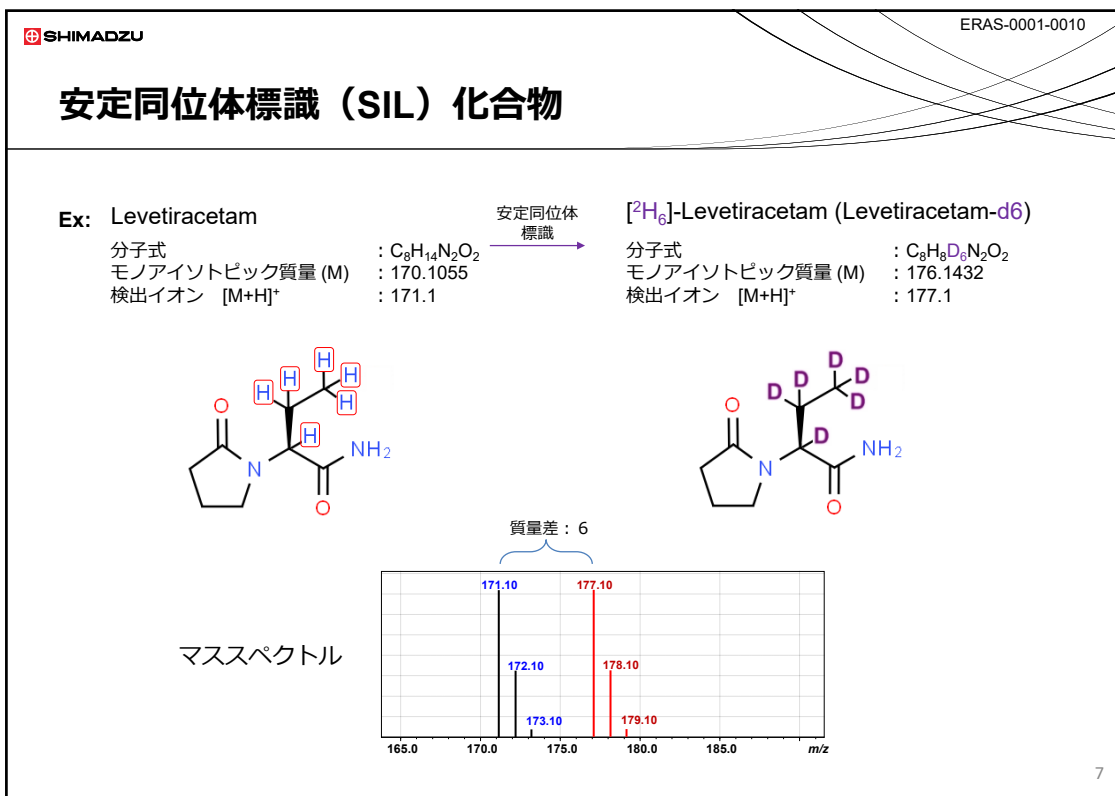
	水素 (H)	重水素 ( $^2\text{H}, \text{D}$ )	三重水素 ( $^3\text{H}, \text{T}$ )
			
質量数	1	2	3
放射性	なし	なし (安定同位体)	あり  (放射性同位体)
天然存在比	99.985%	0.015%	ごく微量

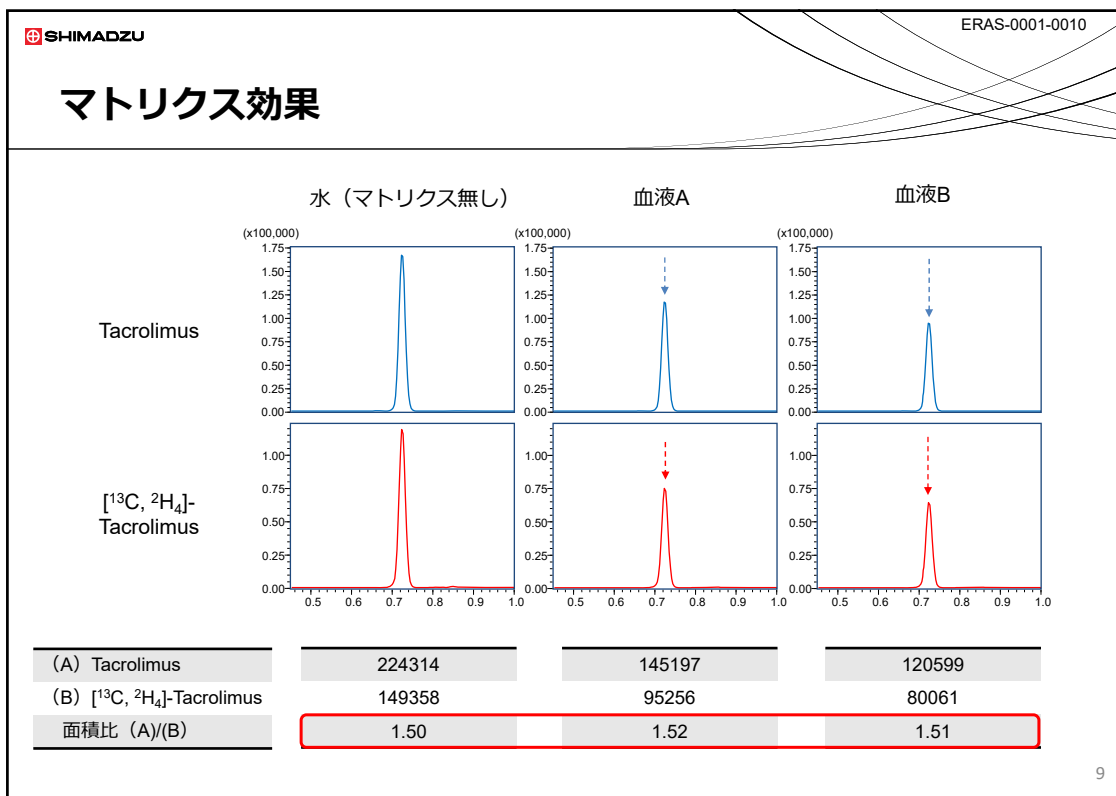
元素記号	質量	天然存在比 (%)
H	1.0078	99.9885
	2.0141	0.0115
C	12.0000	98.93
	13.0034	1.07
N	14.0031	99.632
	15.0001	0.368
O	15.9949	99.757
	16.9991	0.038
	17.9991	0.205
S	31.9721	94.93
	32.9715	0.76
	33.9679	4.29
	35.9671	0.02
Cl	34.9867	75.78
	36.9659	24.22
Br	78.9183	50.69
	80.9163	49.31

地球上の水には平均で約150 ppm（水1 L中に150  $\mu\text{L}$ ）の重水（D<sub>2</sub>O）が含まれている

Ref. <https://plus.chunichi.co.jp/blog/gifu-pharm/article/286/6980/>

6





SHIMADZU ERAS-0001-0010

## 安定同位体標識

重水素 (<sup>2</sup>H or D) 標識 **第一世代**

- ✓ 合成が比較的容易で安価
- ✓ 重水素の脱離 (水素原子との入れ替わり)
- ✓ 同位体効果による保持時間のずれ

<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>18</sup>O 標識 **第二世代**

- ✓ 外的影響を受けにくい部位に導入できるため、化学的に安定
- ✓ 高純度
- ✓ 合成が複雑なため、高価

良い安定同位体標識 (SIL) 化合物とは・・・

• 高純度	: 未標識化合物が含まれていない
• 標識数	: 未標識と重ならない数の導入
• 標識位置	: 安定した位置に導入されている プロダクトイオンへの導入
• 標識種類	: <sup>13</sup> Cの利用

10

ERAS-0001-0010

## SHIMADZU 良いSILとは

- **高純度** : 未標識化合物が含まれていない
- **標識数** : 未標識と重ならない数の導入
- **標識位置** : 安定した位置に導入されている  
プロダクトイオンへの導入
- **標識種類** : <sup>13</sup>Cの利用

安定同位体標識化合物の純度が低い  
⇒ 未標識化合物の定量に影響を与える

Isotope purity (同位体標識の純度)  
≠  
Chemical purity (CP) (目的化合物の純度)

**Ex:** A) Isotope purity (<sup>13</sup>C5, 99%), CP >95%  
⇒ 未標識化合物がほとんどない  
定量に影響なし

B) Isotope purity (D7, 95%), CP >95%  
⇒ 未標識化合物が5%含まれる  
定量に影響あり

**SIL**

**未標識**

11

ERAS-0001-0010

## SHIMADZU 良いSILとは

- **高純度** : 未標識化合物が含まれていない
- **標識数** : 未標識と重ならない数の導入
- **標識位置** : 安定した位置に導入されている  
プロダクトイオンへの導入
- **標識種類** : <sup>13</sup>Cの利用

未標識のマスペクトルとSILのマスペクトルが重ならないようラベル化する必要がある

一部の元素は、天然に存在する同位体の分布が広がっている  
=> 塩素、臭素、または硫黄が存在する場合：より多くの同位体を組み込む必要がある

**Ex: Ambroxol**

**Ex: Lamotrigine**

元素記号	質量	天然存在比 (%)
H	1.0078	99.9885
	2.0141	0.0115
C	12.0000	98.93
	13.0034	1.07
N	14.0031	99.632
	15.0001	0.368
O	15.9949	99.757
	16.9991	0.038
	17.9991	0.205
S	31.9721	94.93
	32.9715	0.76
	33.9679	4.29
	35.9671	0.02
Cl	34.9867	75.78
	36.9659	24.22
Br	78.9183	50.69
	80.9163	49.31

12

SHIMADZU ERAS-0001-0010

## 良いSILとは

- 高純度 : 未標識化合物が含まれていない
- 標識数 : 未標識と重ならない数の導入
- 標識位置 : 安定した位置に導入されている  
プロダクトイオンへの導入
- 標識種類 :  $^{13}\text{C}$ の利用

**Ex: Testosterone**

溶液中で水素/重水素の置換が起こる  
↓  
置換が起こりにくい部位への標識  
 $^2\text{H}$ ではなく $^{13}\text{C}$ を導入

**Ex: Fluindione**

MSイオン源で水素/重水素の置換が起こる  
↓  
 $^2\text{H}$ ではなく $^{13}\text{C}$ を導入

13

SHIMADZU ERAS-0001-0010

## 良いSILとは

- 高純度 : 未標識化合物が含まれていない
- 標識数 : 未標識と重ならない数の導入
- 標識位置 : 安定した位置に導入されている  
プロダクトイオンへの導入
- 標識種類 :  $^{13}\text{C}$ の利用

(LC-MS/MSのMRMモードで定量分析を行う場合)

**Ex: Amlodipine**

フラグメンテーションによるラベル位置の影響  
↓  
プロダクトイオンとして検出される部位への標識  
↓  
擬陽性のさらなる低減

14

ERAS-0001-0010

**SHIMADZU**

## 良いSILとは

- 高純度 : 未標識化合物が含まれていない
- 標識数 : 未標識と重ならない数の導入
- 標識位置 : 安定した位置に導入されている  
プロダクトイオンへの導入
- 標識種類 : **<sup>13</sup>Cの利用**

**Ex: Amphetamine, Methamphetamine**

ODSカラムを用いた逆相クロマトグラフィ

酸性条件

塩基性条件

1. <sup>2</sup>H<sub>11</sub> - amphetamine  
2. <sup>2</sup>H<sub>3</sub> - amphetamine  
3. <sup>13</sup>C<sub>6</sub> - amphetamine  
4. amphetamine  
5. <sup>2</sup>H<sub>11</sub> - methamphetamine  
6. <sup>2</sup>H<sub>3</sub> - methamphetamine  
7. <sup>13</sup>C<sub>6</sub> - methamphetamine  
8. methamphetamine

重水素標識された化合物は保持時間が異なる可能性 → **同位体効果** : 同位体に置き換わったときに生じる物理的・化学的性質の変化

Ref. T. Berg, D.H. Strand / J. Chromatogr. A 1218 (2011) 9366– 9374

15

ERAS-0001-0010

**SHIMADZU**

## SIL代用の注意点

内部標準として目的物質と構造が類似した物質を利用

前処理法での回収率が異なる  
マトリックスによるイオン化効率が異なる ⇒ 定量精度に影響を及ぼす可能性

化合物名	イオン化	内部標準物質	イオン化	添加濃度 (理論値, ng/mL)	測定濃度 (実測値, ng/mL)	誤差 (%)
Diazepam	+	<sup>2</sup> H <sub>3</sub> -Diazepam	+	1	0.98	98%
Flunitrazepam	+	<sup>2</sup> H <sub>3</sub> -Diazepam	+	1	0.96	96%
Triazolam	+	<sup>2</sup> H <sub>3</sub> -Diazepam	+	0.1	0.09	90%
Amobarbital	-	<sup>2</sup> H <sub>3</sub> -Diazepam	+	10	106.2	1062%
Barbital	-	<sup>2</sup> H <sub>3</sub> -Diazepam	+	10	221.1	2211%
Phenobarbital	-	<sup>2</sup> H <sub>3</sub> -Diazepam	+	10	81.1	811%

Diazepam      Flunitrazepam      Triazolam

Amobarbital      Barbital      Phenobarbital

16



ERAS-0001-0010

## SHIMADZU SIL代用の注意点

内部標準として目的物質と構造が類似した物質を利用

前処理法での回収率が異なる  
マトリックスによるイオン化効率が異なる      => 定量精度に影響を及ぼす可能性

化合物名	イオン化	内部標準物質	イオン化	添加濃度 (理論値, ng/mL)	測定濃度 (実測値, ng/mL)	誤差 (%)
Diazepam	+	[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-Diazepam	+	1	0.98	98%
Flunitrazepam	+	[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-Diazepam	+	1	0.96	96%
Triazolam	+	[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-Diazepam	+	0.1	0.09	90%
Amobarbital	-	[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-Phenobarbital	-	10	9.2	92%
Barbital	-	[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-Phenobarbital	-	10	8.51	85%
Phenobarbital	-	[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-Phenobarbital	-	10	10.3	103%

Diazepam      Flunitrazepam      Triazolam

- ✓ 前処理での回収率
- ✓ マトリックス効果
- ✓ イオン化モード

Amobarbital      Barbital      Phenobarbital

定量する物質・分析法に  
適した内部標準を選択する

17

ERAS-0001-0010

## SHIMADZU SILを用いたアプリケーション例

### 血漿中のRemdesivirおよび代謝物の一斉分析

**Remdesivir**      **GS-441524**

\* <sup>13</sup>C標識位置

前処理フロー

血漿      SIL溶液      アセトニトリル

Remdesivir      GS-441524

島津LC-MS/MSシステム

SILの濃度は検量線の1/3くらいに設定  
(1~100 mg/Lの場合は30 mg/L)

**SHIMADZU** Application News No. **C217** **LC-MS/MS**  
全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステムによる  
ヒト血漿中のRemdesivirおよび代謝物の一斉分析

要約

本稿は、全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステムによるヒト血漿中のRemdesivirおよび代謝物の一斉分析について報告する。本システムは、全自動前処理装置とLC/MS/MSシステムを統合し、分析の効率性を向上させた。本稿では、本システムの構築と検証結果について詳しく説明する。

**SHIMADZU** Application News No. **C218** **LC-MS/MS**  
ヒト血漿中のRemdesivirおよび代謝物の  
一斉分析

要約

本稿は、ヒト血漿中のRemdesivirおよび代謝物の一斉分析について報告する。本システムは、全自動前処理装置とLC/MS/MSシステムを統合し、分析の効率性を向上させた。本稿では、本システムの構築と検証結果について詳しく説明する。

18


ERAS-0001-0010

## Alsachim SAS

2005年 フランス・ストラスブール近郊に設立  
2017年 島津製作所と経営統合

- ✓ 安定同位体標識物質を合成・製造する試薬メーカー
- ✓ <sup>13</sup>Cの安定同位体の標識
- ✓ 約6000以上の安定同位体標識された物質が製造可能



a Shimadzu Group Company




19



ERAS-0001-0010

## 日本国内お問い合わせ先


SHIMADZU | 株式会社 島津ジーエルシー  
Excellence in Science



https://solutions.shimadzu.co.jp/cgi/ac?cmd=1&url=/glc/shopping/reagent/level2/j1.html



20

## 本日のまとめ

- ◆ 内標準法による定量分析では**安定同位体試薬**の利用が最適！
- ◆ 良いSILとは？
  - 高純度 : 未標識化合物が含まれていない
  - 標識数 : 未標識と重ならない数の導入
  - 標識位置 : 安定した位置に導入されている  
プロダクトイオンへの導入
  - 標識種類 :  $^{13}\text{C}$ の利用
- ◆ SILを用いた分析例「血漿中のRemdesivirおよび代謝物の一斉分析」
- ◆ Alsachim SAS 安定同位体試薬の製造

本発表内に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。  
なお、本発表中では「TM」、「®」を明記していません。