

重水素標識化法の開発

岐阜薬科大学 佐治木 弘尚

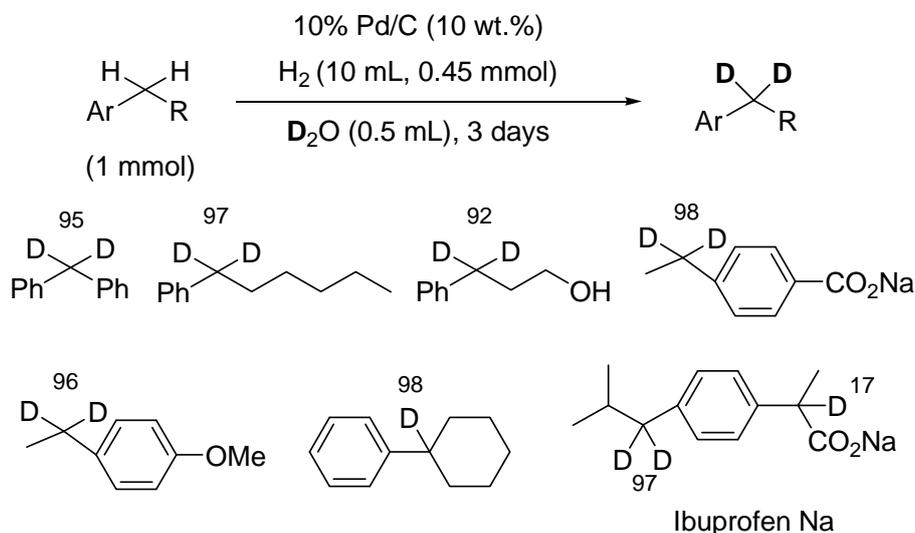
1. はじめに

安定同位体である重水素(D)で標識された化合物は、長期間の保存に耐えるとともに生体構成成分の構造解析や反応メカニズムの解明に利用できるため、様々な研究分野における有用性が指摘されている。例えば、重水素で標識されたアミノ酸や核酸は、たんぱく質やオリゴヌクレオシドの高次構造の解析研究、酵素メカニズム解明等への応用が期待される。また、GC/MS を用いた安定同位体(SI)トレーサー法は薬物代謝の研究、食品中の残留農薬や環境ホルモン等の検出に極めて優れた方法であり、その内部標準物質として分析対象化合物と化学的・物理的性質が酷似し、挙動がほぼ等しい安定同位体を用いるのが理想的とされている。特に同一分子内に複数の重水素が導入された内部標準物質は、対象となる化合物の検出・定量を容易にするため、その簡便合成法の開発が望まれている。重水素標識化合物は、あらかじめ重水素化された入手容易な小分子シントンを出発原料として、多段階工程を経て合成する方法が一般的であるが、この場合、全合成に匹敵する、あるいはそれ以上の時間・労力・コストが必要となる。一方、水素-重水素(H-D)交換反応による目的化合物への重水素の直接導入は簡便な方法である。直接的H-D交換反応として各種の手法(酸触媒反応、塩基触媒反応、遷移金属触媒反応、マイクロ波を利用した交換反応、超臨界重水を用いた反応)が報告されているが¹⁾、そのほとんどが芳香環や活性メチレン、あるいはベンジル位等の活性な脂肪族炭素上での交換反応であり、不活性なメチル、メチレン及びメチン炭素上での報告例は極めて少ない²⁾。さらに、従来法では重水素を使用したり³⁾、特別な装置や、高温あるいは加圧条件、強酸性あるいは強塩基性条件を必要とするとともに、重水素化効率や位置選択性が低いなどの問題点を有している。今回我々は重水素ガス(D₂)を使用せず、加えて特別な装置並びに技術を必要としない、重水(D₂O)を重水素源とした直接的H-D交換反応による簡便標識法を開発した。

2. ベンジル位選択的 H-D 交換反応⁴⁾

位置選択的なH-D交換反応の開発は、目的化合物への直接的な重水素の導入が可能となるため、重水素標識化合物の調製を極めて容易にする。ベンジル位選択的H-D交換反応としては、DMSO-*d*₆-NaH^{2h}、Pd-D₂²ⁱ、Co₂(CO)₈-D₂^{2g}などの方法が報告されているが、量論反応であったり、加熱・加圧条件下で重水素ガスを用いる必要があった。我々は、触媒量の水素(H₂)及びPd/C存在下、重水中、常温・常圧下撹拌すると、高効率的にベンジル位選択的H-D交換反応が進行することを見出し、種々の基質に適用することでその一般性を確立

した(Scheme 1, 構造式の数字は重水素化率を示す)。なお本法は、分子内にカルボン酸が共存する基質で重水素化率の低下傾向が認められたが、この点は、ナトリウム塩とすることで改善された。

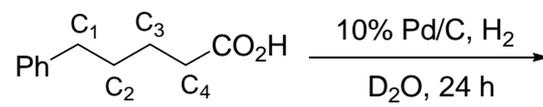


Scheme 1

3. 不活性アルカン上での多重 H-D 交換反応⁵⁾

次に加熱還流(油浴温度110 °C)したところ、ベンジル位のみならず不活性であると考えられるメチレン炭素上でも重水素化が進行することが明らかとなった。加熱条件下では、基本的にアルキル鎖の重水素化率はベンゼン環から遠くなるほど低下する傾向が認められた (Table 1, entries 1 and 4)。なお、この重水素化反応は水素ガスあるいはPd/Cが存在しないと全く進行しない(entries 2 and 3)。重水素化率は反応温度による顕著な影響を受け、一般に高温になるほど効率よく反応が進行した。カルボン酸誘導体の場合、封管を用いて160 °Cまで反応温度を上げるとアルキル側鎖の重水素化はほぼ完全に進行した (entry 5)。

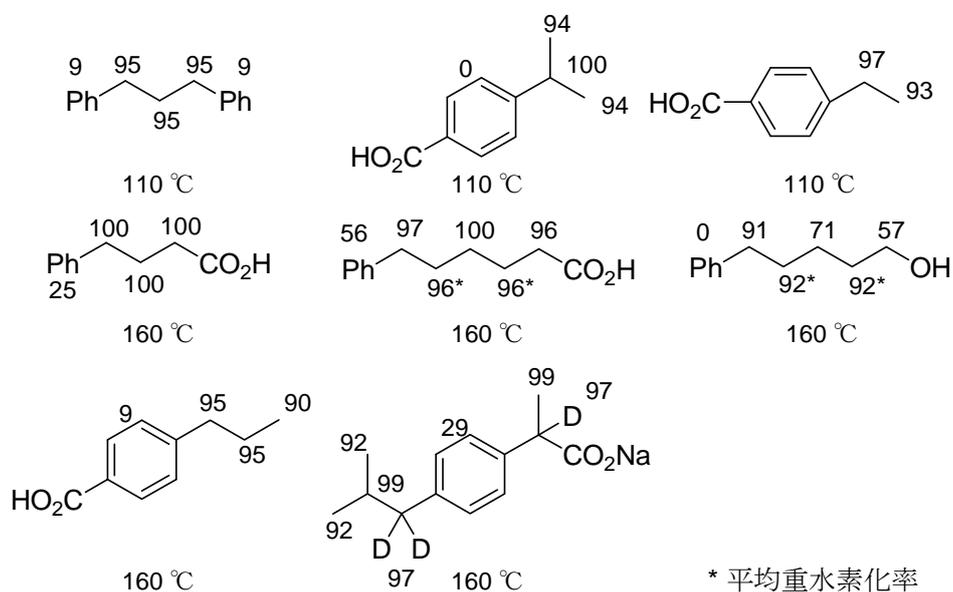
Table 1 Temperature dependence of Pd/C-catalyzed H-D exchange



entry	T (°C)	D content (%)			
		Ph	C ₁	C ₂ +C ₃	C ₄
1	110	26	97	80	0
2 ^a	110	0	0	0	0
3 ^b	110	0	0	0	0
4	140	63	96	84	29
5	160	67	95	94	94

^a Without hydrogen gas. ^b Without 10% Pd/C.

加熱条件下でのH-D 交換反応を種々の基質に適用したところ、官能基の種類により重水素化効率に差が生じるものの、110~160 °Cで効率的にH-D交換反応が進行することが明らかとなった。その一例をScheme 2に示す。



Scheme 2

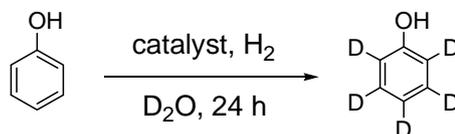
なお、封管中160 °Cまで加熱すると圧力が極めて高くなるものと誤解を受けやすいが、気体の状態方程式に基づく理論計算値では約1.5気圧程度にすぎない。また、実測値も最大で2.5気圧程度であり、計算値との約1気圧の差は、反応温度の上昇により反応系中の重水の蒸気圧が上昇したために生じている。従って本法は、重水を重水素源としたH-D交換反応が、水素ガスの添加に基づくPd/Cの活性化効果により、これまでに報告例のない穏和な条件下、すなわち常圧~中圧、160 °C以下で効率的に進行する手法である。

4. 白金族触媒による芳香環重水素化法の開発とその応用⁶⁾

前節で述べたH-D 交換反応は基本的にアルキル側鎖にのみ適用可能であり、芳香環上での重水素化率は低い。しかし様々な基質を用いて適用範囲を検討する過程で、芳香環上でも効率良く重水素化が進行する基質があることが明らかとなった。すなわちフェノールやアニリン誘導体等、電子供与基を有する芳香環が効率よく重水素化された。また、触媒として同族のPt/C を用いたところ、より穏和な条件下、芳香環上でH-D 交換反応が進行した。例えば無置換のフェノールは、室温下ほぼ完全に重水素化された(Table 2、Entry 1)。また、アルキル側鎖を有する芳香族化合物の場合、芳香環ではPt/C で、アルキル側鎖ではPd/C で効率よく重水素化が進行し、用いる金属の違いにより重水素化されやすい部位が異なることが判明した。一方、電子求引基であるカルボキシル基を有する化合物は、電子供与基を

持つ化合物と比較して高温条件を必要とし、カルボキシル基の増加に伴い重水素化率の低下傾向が認められた。特に強力な電子求引基であるニトロ基は重水素化反応を強力に抑制した(Scheme 3)。

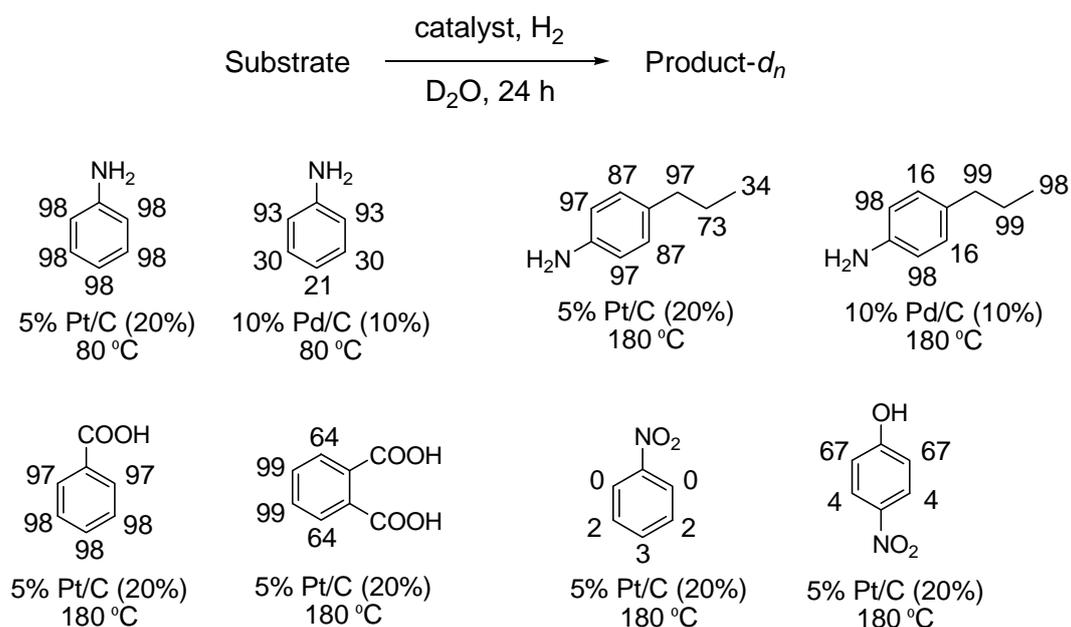
Table 2 Pt/C or Pd/C-D₂O-H₂ catalyzed H-D exchange reaction of Phenol.^a



Entry	Catalysts (w/w)	Temp.	D content (%) ^b
1	5% Pt/C (20%)	rt	
2	10% Pd/C (10%)	80 °C	
3	10% Pd/C (10%)	180 °C	

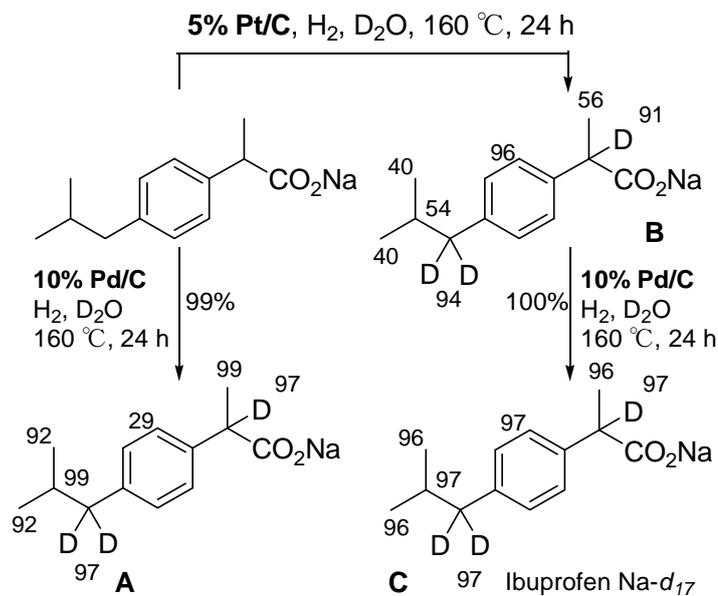
a) 500 mg (5.3 mmol) of phenol was used. Reactions were carried out using catalyst (wt% of phenol) in D₂O (99.9% D content, 17 mL) in a sealed tube.

b) Determined by ¹H-NMR. c) Indicated as the average content.



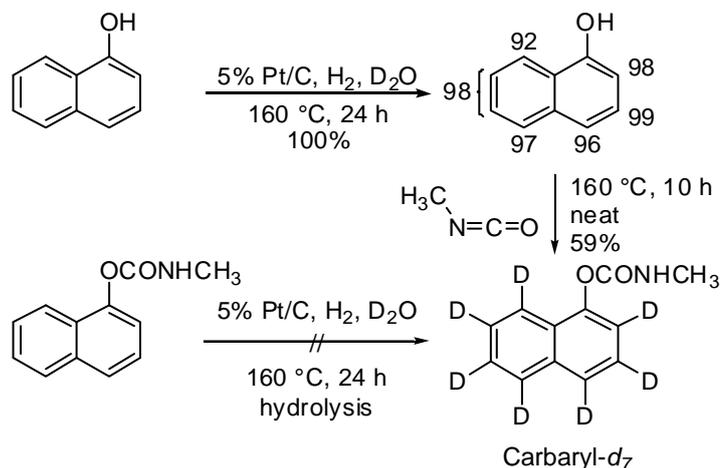
Scheme 3

今回、この重水素標識化法を様々な生物活性物質に適用した。解熱鎮痛薬であるイブプロフェンを、Pd/C触媒下に反応すると側鎖は定量的に重水素化されるが、ベンゼン環の重水素化率はわずか29%である (Scheme 4, A)。一方、Pt/Cを触媒とした場合にはベンゼン環は96%重水素化されるが側鎖の重水素化率は低い (B)。そこでこれらの反応を段階的に組み合わせたとこ、すべてのC-Hを効率よくC-Dに置き換えることができた (C)。



Scheme 4

一方、農薬であるカルバリルは殺虫剤として使用されているが、コリンエステラーゼ阻害活性を有するため⁷⁾食品衛生法で多くの農産物中の残留基準が0.1~1.0 ppm 以下と規定されている。カルバリルの微量定量には、多重重水素化体を内部標準物質とした安定同位体トレーサー法の適用が望まれている。そこで、Pt/Cを触媒として重水中160 °Cで重水素化したと



Scheme 5

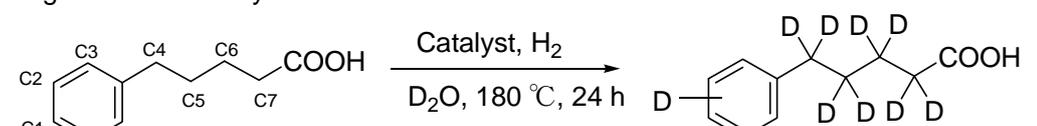
ころ、カーバメート側鎖の加水分解が進行し目的とする多重重水素標識体は得られなかった。しかし、 α -ナフトールを重水素化した後、メチルイソシアネートでカーバメート化することで、効率良くカルバリル- d_7 を合成することができた (Scheme 4)。

5. Pd/C-Pt/C 混合触媒の相乗効果⁸⁾

前節 Scheme 4 では5% Pt/C を触媒とした芳香環の重水素化と10% Pd/C を触媒としたアルキル側鎖の重水素化を組み合わせ、イブプロフェン- d_{17} を合成した。この反応は2段階で実施したが、両触媒を同時に用いたワンポット反応が可能となれば、コストや時間の削減にもつながり様々なメリットがある。また、触媒の組み合わせによる触媒活性の向上や新機能の発現も期待される。そこで、5-フェニル吉草酸を基質とした10% Pd/C-5% Pt/C 共触媒による重水素化を検討した。その結果、芳香環(C1~C3)及びアルキル側鎖(C4~C7)すべてで効率よく重水素化が進行し、目的とする多重重水素標識体を合成することができた

(Table 3, entry 6)。なお、10% Pd/C のみを触媒として用いた場合には、芳香環 C3 位での重水素導入率が低かった (entry 1)。また、触媒の増量(20 重量%)による顕著な効果は認められなかった(entry 2)。一方 Pt/C 触媒を単独で用いた場合には、C1、C2 のみで効率よく重水素化が進行した (entry 3 and 4)。さらにこの基質では、5% Pt/C を触媒とした芳香環の重水素化と 10% Pd/C を触媒としたアルキル側鎖の重水素化を組み合わせた 2 段階の反応でも、芳香環 C3 位の重水素化率は向上しなかったことから (entry 5)、10% Pd/C-5% Pt/C 共触媒による相乗効果により触媒活性が向上したものと考えられる。

Table 3. Comparison of deuterium efficiencies of 5-phenylvaleric acid using Pd/C or Pt/C independently and by mixing them as a catalyst. ^[a]



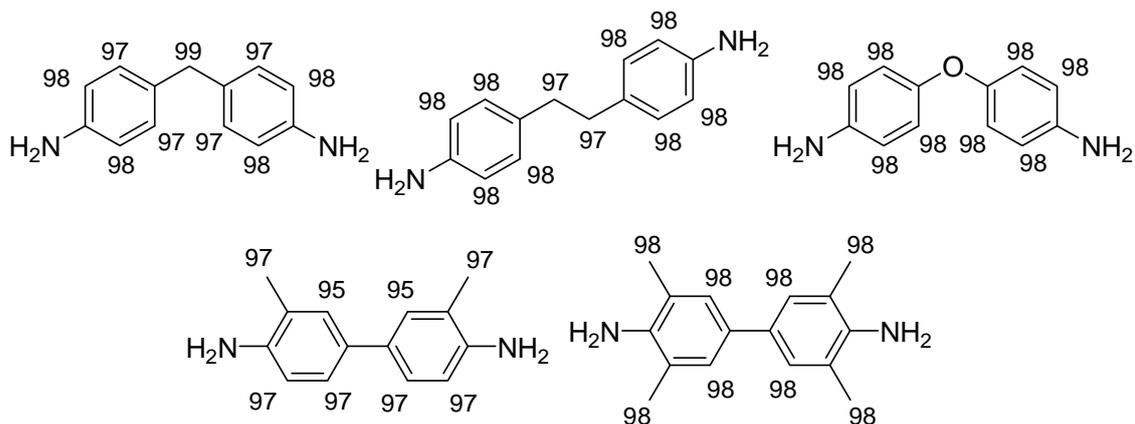
Entry	Catalyst (wt%)	D content [%] ^[b]						Yield [%]
		C1	C2	C3	C4	C5, C6	C7	
1	10% Pd/C (10%)	96	96	14	98	96	96	88
2	10% Pd/C (20%)	>93	93	<36	98	97	97	82
3	5% Pt/C (20%)	97	97	19	28	8	10	92
4	5% Pt/C (40%)	95	95	13	6	2	7	92
5 ^[c]	10% Pd/C (10%)	97	97	30	97	97	97	84
6	10% Pd/C (10%) + 5% Pt/C (20%)	97	97	97	97	97	94	84

^[a] 500 mg (2.81 mmol) of the substrate were used and reactions were carried out under ordinary H₂ pressure using the catalyst in D₂O (99.9% D content, 17 mL) in a sealed tube.

^[b] D contents were determined by ¹H NMR after conversion of the carboxylic acid to the methyl ester on the basis of the integration of the methyl protons and confirmed by ²H NMR, ¹³C NMR and mass spectrometry.

^[c] The product of entry 3 was used as a starting material.

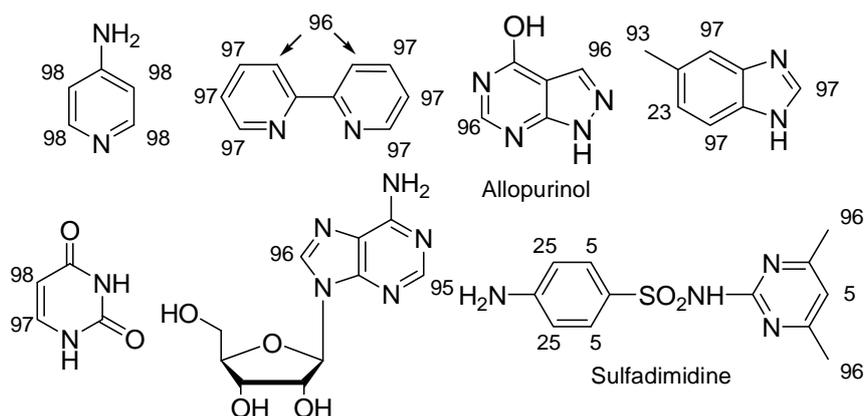
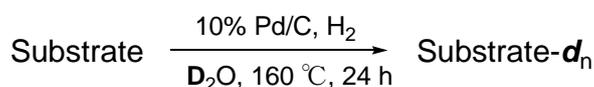
次に本反応の応用として、ポリイミド合成の際のモノマー原料となる、ジアニリン誘導体の重水素化を実施した。ポリイミドは耐熱性に優れ加工しやすく、さらに C-H をすべて重水素化することで C-H 伸縮振動に基づく光吸収が消失するため、光ファイバーとしての用途が期待される⁹⁾。10% Pd/C (10wt%) および 5% Pt/C (20 wt%) を触媒として 180 °C で 24 時間加熱することで、芳香環並びにアルキル側鎖双方を効率よく重水素化することができた (Scheme 6)。なお、ここで合成した多重重水素化ジアニリンをピロメリト酸無水物と重合したポリイミド-*d_n* の合成にもすでに成功している。



Scheme 6

6. 複素環化合物の重水素化¹⁰⁾

医薬品や天然物には基本骨格として複素環を含有するものが多い。そこで複素環化合物を基質とした 10% Pd/C による重水素化を検討したところ、効率よく H-D 交換反応が進行した (Scheme 7)。なお、アデノシン等の核酸誘導体では糖部は全く重水素化されず、塩基部のみがほぼ定量的に標識されることも明らかとなった¹¹⁾。また、家畜用合成抗菌剤として使用されているスルファジミジン



Scheme 7

の場合にも、複数の重水素が導入された。この多重重水素化スルファジミジンを、残留農薬定量用内部標準物質として適用するための検討が現在加えられている。

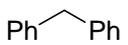
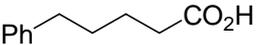
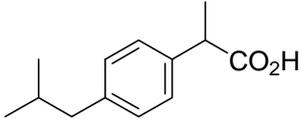
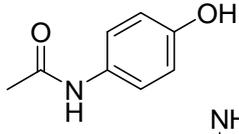
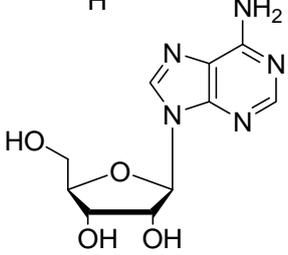
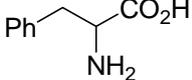
7. トリチウム標識化法への応用¹²⁾

トリチウム (T) 標識化合物は、重水素標識化合物の 100 万分の 1 の濃度まで検出可能であることから、生体内極微量代謝物質の検出や定量におけるトレーサーとして用いられている。従来のトリチウム標識体の合成法としては、トリチウムガス (T₂) を用いた金属触媒存在下での還元反応やトリチウム化された還元剤 (LiAlT₄ 等) による方法、遷移金属触媒を用いた H-T 交換反応が報告されているが、基質の合成や精製が困難である場合が多い。また大量の触媒が必要であったり、高価で比放射能が高く危険なトリチウムガスを使用する等

の問題点を有している。一方、比較的取り扱いが容易なトリチウム (HTO) 水からの H-T 交換反応も報告されているが、トリチウムガスを用いた場合と比較して、トリチウム導入効率が低く不純物が混入するといった問題点がある。かかる背景より、操作性、導入効率がともに高いトリチウム標識法の開発は重要である。そこでトリチウム水を用いた Pd/C 触媒による簡便かつ効率的なトリチウム標識反応の確立を目指して検討した。

その結果、純粋なトリチウム水の 10 億分の 1 という高希釈トリチウム水(2.22 kBq/mmol)を用いた場合でも、室温下効率的にトリチウムが導入されることが分かった(Table 4、entry 1)。また、加熱条件下では、さらに効率良くトリチウムが導入された(entries 2-7)。特に、多重にトリチウムが導入されることで、用いた HTO の比放射能よりも、生成するトリチウム標識体の比放射能の方が 2~5 倍高くなる場合もあり(entries 1, 4 and 5)、効率の高さが強く示されている。

Table 4 Tritium incorporation with use of the Pd/C-HTO-H₂ System

Entry	Substrate	Catalyst, H ₂		Substrate-T _n		Yield (%) ^a
		Catalyst	Temp (°C)	HTO	Product	
1		10% Pd/C	rt ^b	2.22	1.28	100
2		10% Pd/C	160	0.67	1.82	98
3		10% Pd/C	160	0.67	3.42	96
4		5% Pt/C	160	2.22	4.26	72
5		10% Pd/C	110	2.22	0.70	99
6		10% Pd/C	110	2.22	0.62	94

^a Reaction conditions: Substrate (0.5 mmol), 10% Pd/C (10 wt%) or 5% Pt/C (20 wt%), HTO (2.0 mL).

^b For 72 h.

8. おわりに

以上不均一系 Pd/C 及び Pt/C を触媒とした、水素ガスを活性化剤、重水(トリチウム水)を重水素(トリチウム)源とする、簡便かつ効率的な H-D(T) 交換反応の開発について示した。本法は反応条件が穏和であり、適用可能な基質も広範なため、多方面での適用が期待される。

9. 参考文献

- 1 (a) T. Junk *et al.* *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 26, 401; (b) Elander, N.; Jones, J. R.; Lu, S.-Y.; Stone-Elander, S. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 239; (c) K. Ofosu-Asante *et al.* *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 5452.
- 2 (a) J. V. Castell *et al.* *J. Labelled Compds. Radiopharm.* **1994**, 34, 93; (b) M. Okazaki *et al.* *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, 68, 1024; (c) M. Pacchioni *et al.* *Tetrahedron. Lett.* **2002**, 43, 771; (d) C. Y. Y. Hisiao *et al.* *Lipids* **1975**, 9,913; (e) D. K. Takehara *et al.* *J. Catal.* **1992**, 133, 279 and 294; (f) T. S. Chen *et al.* *J. Labelled Compds. Radiopharm.* **1971**, 6, 285; (g) T. A. Weil *et al.* *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 48; (h) M. H. Gaston *et al.* *Org. Prep. Proced. Int.* **1985**, 17, 138; (i) K. Ofosu-Asante *et al.* *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 5452; (j) J. Azran *et al.* *J. Catal.* **1992**, 148, 648; (k) T. Tsukinoki *et al.* *J. Labelled Compds. Radiopharm.* **1994**, 34, 839; (l) T. Tsukinoki *et al.* *J. Chem. Res. (S)* **1996**, 66.
- 3 我が国では D₂ ガスの工業的生産をしていないので輸入に頼っているが、可燃性ガスであると併に戦略物質に指定されているため、輸入・搬送上の規制が厳しい。従って、高価で (30 L あたり約 10 万円) で入手に時間がかかるなど問題点が多い。
- 4 H. Sajiki, K. Hattori, F. Aoki, K. Yasunaga, K. Hirota, *Synlett* **2002**, 1149.
- 5 Sajiki, H.; Aoki, F.; Esaki, H.; Maegawa, T.; Hirota, K. *Org. Lett.* **2004**, 6, 1485.
- 6 Sajiki, H.; Ito, N.; Esaki, H.; Maesawa, T.; Maegawa, T.; Hirota, K. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 6996.
- 7 Branch, R. A.; Jacqz, E. *Am. J. Med.* **1986**, 80, 659.
- 8 Ito, N.; Watahiki, T.; Maesawa, T.; Maegawa, T.; Sajiki, H. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 1025.
- 9 (a) T. P. Russell, A. Karim, A. Mansour, G. P. Felcher, *Macromolecules* **1988**, 21, 1890; (b) S. F. Tead, E. J. Kramer, T. P. Russell, W. Volksen, *Polymer* **1992**, 33, 3382; (c) N. C. Stoffel, S. Chandra, E. J. Kramer, *Polymer* **1997**, 38, 5073; (d) 二瓶栄輔, 小池康博 *工業材料* **1996**, 44, 29.
- 10 Esaki, H.; Ito, N.; Sakai, S.; Maegawa, T.; Monguchi, Y.; Sajiki, H. *Tetrahedron*, in press.
- 11 Sajiki, H.; Esaki, H.; Aoki, F.; Maegawa, T.; Hirota, K. *Synlett* **2005**, 1385.
- 12 Maegawa, T.; Hirota, K.; Tatematsu, K.; Mori, Y.; Sajiki, H. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 10581.