

報 文

重水素化エボジアミンの合成と LC-MS/MS によるエボジアミン定量への応用

堤内要¹⁾, 平野正悟¹⁾, 山下均²⁾¹⁾ 中部大学応用生物学部, ²⁾ 中部大学生命健康科学部

要 旨

LC-MS/MS 測定において安定同位体試料を内部標準物質に用いることは分析精度の向上に非常に効果的である。しかし、分析対象の安定同位体試料が存在していない、あるいは非常に高価であることが多く、これらの点を克服することで更なる高感度分析が期待できる。本研究では、近年抗肥満剤として注目されるエボジアミン(ED)の重水素化を、白金炭素(Pt/C)を重水中水素雰囲気下で用いる芳香環の H-D 交換反応により行った。また、得られた重水素化物を LC-MS/MS による ED の定量分析に応用し、生物試料中の ED を精度よく高感度に分析できることを明らかにした。

1. はじめに

エボジアミン(ED)は中国中～南部に自生するミカン科の植物ゴシュユ(学名: *Tetradium ruticarpum*)の果実から抽出されるインドールアルカロイドである。ゴシュユは古くから漢方薬として利用されており、ED はその有効成分の1つである。その作用は鎮痛、抗肥満、血管拡張、抗腫瘍、抗炎症とされている (Chiou, 1992; Heo, 2009; Kobayashi, 2001; Takada, 2005; Wang, 2006; Yamashita, 2015)。

最近ではアルツハイマー病についても効果が期待されており、様々な疾患に対する ED の作用メカニズムの研究が広範囲に展開されている (Fang, 2020; Li, 2022; Luo, 2021)。ED の体内動態も同様に調べられており、血清試料から液体クロマトグラフィータンデム質量分析法(LC-MS/MS)を用いて分析する方法が既に報告されている (Liang, 2018)。その定量下限値は 1.230 ng/mL であり、マウスに薬剤を飲ませた時の血清中 ED 濃度 2–6 ng/mL を分析するに足る感度である。しかし、その試料調製には血清試料を 200 μ L も要する。実験方法を詳しくみると、1匹のマウスから採取する血清の量は 500 μ L であり、同一試料から 3 検体の試料作製は困難であるこ

とがわかる。ゆえに、可能であればさらに少量の血清試料での高感度分析を可能にする必要がある。

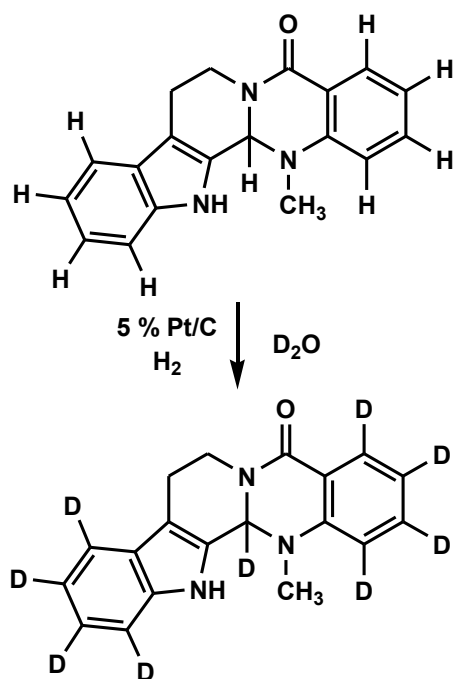
LC-MS/MS は分離部である LC で分析対象を他の成分と完全に分離できなくても、その化合物の分子量や装置内で分解させた時のフラグメントの質量電荷比(m/z)によって正確に定量することができる。そこで、血液や臓器などの複雑な生体試料でも比較的高い真度で定量することができる訳であるが、ED の分析ではさらなる高精度化が必要となった。

分析精度を改善するための方法として内部標準法が用いられることがある。内部標準法とは目的化合物と同じ挙動を示し、かつ分析機器で区別することができる化合物を内部標準物質として用いる方法である。前処理段階の分析試料に既知濃度の内部標準物質を添加し、目的化合物の測定値と内部標準の測定値から得られる信号強度の比を用い測定誤差を補正する。LC-MS/MS 分析では、内部標準物質は目的化合物とほぼ同じ性質を持つことが好ましく、²H(D), ¹³C, ¹⁸O のような安定同位元素で標識された化合物を用いることが最適とされている。これは、非標識化合物と比べ同じ性質を持ちながらも分子量が異なるため、LC-MS/MS で区別して分析すること

ができるためである (Desiderio, 1998) .

しかし、水素、炭素、窒素、酸素の安定同位体はそれぞれ 0.0156%(^2D), 1.11%(^{13}C), 0.36%(^{15}N), 0.0735%(^{17}O), 0.1995%(^{18}O)と極めて低い割合でしか自然界には存在しないため、手に入れるのは非常に困難である (Lide, 2002). また、安定同位元素標識化合物を人為的に合成することは可能であるが、安定同位元素が多量に必要であり、かつ安定同位元素そのものが非常に高価であるため、市販されている安定同位標識元素化合物も高価なものとなっている。また、構造が複雑なものは化学合成が難しいため市販されていないことが多い。ED に関しては、安定同位元素標識化合物が全く合成されておらず、入手は不可能という状況であった。

そこで我々は ED の安定同位元素標識化合物を調製すべく、白金炭素(Pt/C)を触媒に用いた ED の重水素化反応を行った(図式1)。



Scheme 1

この H-D 交換反応は、岐阜薬科大学の佐治木らが開発した方法で (佐治木, 2013), 安定同位元素標識化合物の入手が困難な場合に有効なため、LC-MS/MS を用いた生理活性物質の内部標準物質調製などに活用されている (Kanemitsu, 2019; 堤内, 2019). ただし、この方法による ED の H-D 交換反応は未だ検討されておらず、その結果の学術的意義は高い。さらに、得られ

た重水素化 ED が LC-MS/MS を用いた ED の定量分析に有効であるかについても調査したので報告する。

2. 材料と方法

2-1. 試薬および装置

5%Pt/C は和光純薬工業株式会社から購入した。クロロホルム(CHCl_3), メタノール(MeOH), ギ酸(FA), アンモニア水(NH_3aq), 酢酸アンモニウム(AcONH_4), 重メタノール(CD_3OD), 重クロロホルム(CDCl_3)は和光純薬工業株式会社の特級を用いた。蒸留水は和光純薬工業株式会社の高速液体クロマトグラフィー用を使用した。アセトニトリル(ACN)と重水(D_2O)は Sigma-Aldrich 社から購入し、ED はナカライテスク社から入手した。ミニバキュームチューブは LAB CAT 社のものを用いた。フィルターはポアサイズが $0.22\ \mu\text{m}$ と $0.5\ \mu\text{m}$ のものを使用し、 $0.22\ \mu\text{m}$ のものは Millex 社の Millex-HV を $0.5\ \mu\text{m}$ のものは ADVANTEC 社の DISMIC-03JP を利用した。カートリッジはバイオタージ社の EVOLUTE CX を使用した。遠心分離は TOMY 社の PMC060 を使用した。重水素化反応の際の加熱および攪拌は IKA 社の C-MAGH57 (EIS-D5 装着)を用いた。ED の分取には株式会社島津製作所の LC-20AD, DGU-20A₅, CTO-10A_{VP}, SPD-10A_{VP} からなる高速液体クロマトグラフ (HPLC) を利用した。構造解析には日本電子株式会社の ECS-400 核磁気共鳴 (NMR) 分光光度計を用いた。LC-MS/MS を用いた ED の定量分析では AB Sciex 社の API4000 と GL Sciences 社の LC800 を使用した。

2-2. Pt/C を触媒に用いた ED の H-D 交換反応

ミニバキュームチューブに ED 15 mg ($0.050\ \mu\text{mol}$) と D_2O 2.0 mL を加え、混合させ、5% Pt/C と攪拌子を加えた。その後、ミニバキュームチューブ内を水素置換し、 180°C の油浴中で 24 時間反応させた。反応させた溶液を ACN 約 3.0 mL と混合させ、ミニバキュームチューブ内からビーカーに移した。その後全体の液量が 20 mL 以上になるように ACN を加えた。超音波を 5 分間照射したのち、溶液をポアサイズ $0.22\ \mu\text{m}$ のシリンジフィルター (Millex-HV) を使用して濾過した。濾過した溶液を真空乾燥させ、冷凍庫に保存した。

2-3. HPLCを用いた重水素化ED (ED- d_n) の精製

HPLC を用い、重水素化した ED の精製を行った。ED- d_n の粗精製物を 25 mL の MeOH に溶かし、HPLC に 1.8 mL ずつインジェクションし、精製を行った。その際の HPLC の条件を表 1 に示した。

Table 1. HPLC condition for purification of evodiamine- d_n

LC system	LC-20AD, DGU-20A5, CTO-10A _{VP} , SPD-10A _{VP} (Shimadzu)
Column	Inertsil ODS-3 (G + $\phi 20 \times 250$ mm) (GL Sciences)
Mobile phase	A : 0.50 % FA aq B : 0.50 % FA MeOH
Flow rate	2.5 mL/min
Gradient program	B (%): 70 (0 min) $\rightarrow$ 75 (40 min) $\rightarrow$ 95 (45 – 50 min) $\rightarrow$ 70 (55 – 80 min)
Column temperature	40°C
Injection volume	1.8 mL
Detection	UV (254 nm)

2-4. LC-MSおよびLC-MS/MSを用いたED- d_n の分析

ED の重水素化反応の進行状況の確認には LC-MS, ED の定量分析には LC-MS/MS を用いた。LC-MS および LC-MS/MS の測定条件をそれぞれ表 2, 3 に示した。結果の部分でも述べるが、反応の進行状況を把握する段階では、イオン化促進のために一般的に用いられるギ酸を添加剤としていたが、より高感度測定を目指した LC-MS/MS の測定条件検討において、添加材はアンモニアが良いことが判明したため、LC-MS と LC-MS/MS の測定条件は溶離液の添加剤が異なっている。

Table 2. LC-MS condition for monitoring H-D exchange reaction of ED

LC system	LC-800 (GL Sciences)
Column	Inertsil ODS-3 ($\phi 1.0 \times 150$ mm) (GL Sciences)
Mobile phase	A : 10 mmol/L Formic acid aq B : ACN
Flow rate	50 μ L/min
Gradient program	B (%): 50 (0 min) $\rightarrow$ 98 (5-20 min) $\rightarrow$ 50 (25–35 min)
Column temperature	40°C
Injection volume	5.0 μ L
MS system	API4000 (AB SCIEX)
Ionization	Electrospray
Polarity	Positive
Collision gas	4 eV
Curtain gas	50
Ionspray voltage	4500
Temperature	300 °C
Scan type	Q1MS

なお、ED- d_n の重水素化率の計算は図式 1 に示された重水素が 9 つ置換した ED- d_9 を基準として考え、以下の計算式 1 によって算出した。

$$D(\%) = 100 \times \frac{MW_{\text{Products}} - MW_{\text{ED}}}{MW_{\text{ED-}d_9} - MW_{\text{ED}}} \quad \dots \text{Eq. 1}$$

$$MW_{\text{Products}} = \frac{\sum_i M_i I_i}{\sum_i I_i} \quad \dots \text{Eq. 2}$$

M : ED- d_n のプロトン付加体の m/z の値 – 1.008

I : ED- d_n のプロトン付加体のピーク強度

i : ED- d_n のプロトン付加体ピークの m/z の値

Table 3. LC-MS/MS condition for determination of ED- d_n

LC system	LC-800 (GL Sciences)
Column	InertSustain C18 ($\phi 2.1 \times 150$ mm) (GL Sciences)
Mobile phase	A : 10 mmol/L NH_3 aq B : ACN
Flow rate	200 $\mu\text{L}/\text{min}$
Gradient program	B (%) : 60 (0-7 min) $\rightarrow$ 95 (8-13 min) $\rightarrow$ 60 (14-20 min)
Column temperature	40°C
Injection volume	5.0 μL
MS system	API4000 (AB SCIEX)
Ionization	Electrospray
Polarity	Positive
Collision gas	4 eV
Curtain gas	50
Ionspray voltage	4500
Temperature	300 °C
Scan type	MRM
Monitor ion	m/z 304 > 161 m/z 311 > 164

2-5. NMR を用いた ED- d_n の構造解析

ED- d_n 10 mg を 1.0 % テトラメチルシラン入り CDCl_3 + CD_3OD 混合液 [9 : 1 (v/v)] 0.70 mL に溶解させて ϕ 5 mm の NMR 試料管に入れた。その後、ECS-400 型 NMR 分光光度計 (JOEL) を用いて室温で ^1H -NMR スペクトルを測定した。

2-6. マウス血清試料の前処理

マウス血清 10 μL に ED- d_n の 10 mmol/L NH_3 aq + ACN 混合液 [4 : 6 (v/v)] 溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 5 μL 添加した後、さらに 5 μL の 10 mmol/L NH_3 aq + ACN 混合液 [4 : 6 (v/v)] を加え、1 分間超音波照射を行った。

$\text{MeOH} + \text{CHCl}_3$ 混合液 [1 : 1 (v/v)] を 0.50 mL 加えて 1 分間超音波照射し、遠心分離後上清を回収、窒素を吹付けて乾燥させた。その後 10 mmol/L NH_3 aq + ACN 混合液 [4 : 6 (v/v)] 200 μL で再溶解して LC-MS/MS 測定を行った。

なお、添加回収実験を行う際は、マウス血清に ED- d_n 溶液を加えた後、マウス血清中の ED 濃度が 20, 40, 60, 80, 100 ng/mL となるように ED 標準試料を 5 μL の 10 mmol/L NH_3 aq + ACN 混合液 [4 : 6 (v/v)] の溶液として添加した。

3. 結果と考察

3-1. Pt/C を触媒に用いた ED の H-D 交換反応

既報に準じて、触媒に 5%Pt/C を用いた ED の H-D 交換反応を行った。初めに ED 10 mg (0.033 μmol) , D_2O 2.0 mL, 5% Pt/C 2.0 mg を用いて、水素雰囲気下、180°C の油浴中で反応させた。6 時間ごとに反応液をサンプリングし、LC-MS を用いて反応の進行状況をモニターした。6 および 30 時間後の反応混合物の全イオンクロマトグラム (TIC) を図 1 に示した。

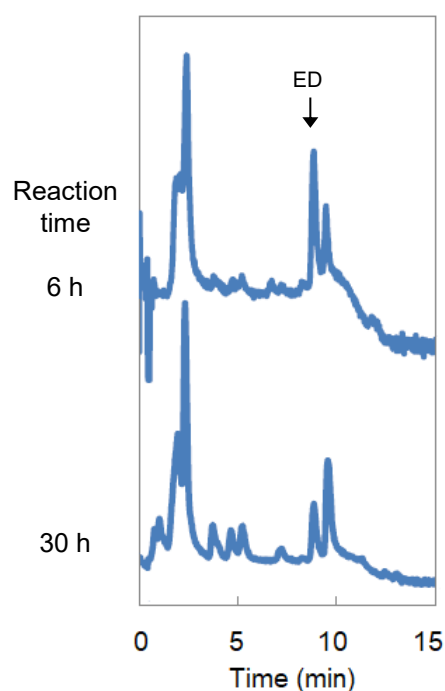


Figure 1. TIC of reaction mixture at 6 and 30 h in H-D exchange reaction of ED with Pt/C (ED, 10 mg (0.033 μmol); 5%Pt/C, 2.0 mg; D_2O , 2.0 mL; H_2 atmosphere; temp., 180°C).

図1のTICにおいてEDは9.1 minで溶出していた。反応時間6時間におけるEDのMSスペクトルは図2のようであった。このスペクトルから反応混合物には未反応のEDとH-D交換反応の進行したED- d_n が混在しているとわかる。一方、9.7 minに溶出したピークは反応時間の経過とともに大きくなっている。反応時間30時間における当該ピークのMSスペクトルは図3の通りであった。 m/z 294を中心として今回検討しているH-D交換反応に特徴的な多重線のピーク群が確認された。 m/z の値

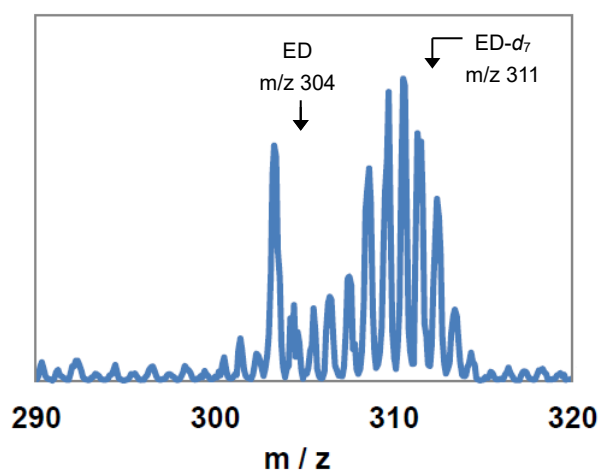


Figure 2. Mass spectrum of ED- d_n at 6 h in H-D exchange reaction with Pt/C (ED, 10 mg (0.033 μ mol); 5%Pt/C, 2.0 mg; D₂O, 2.0 mL; H₂ atmosphere; temp., 180°C).

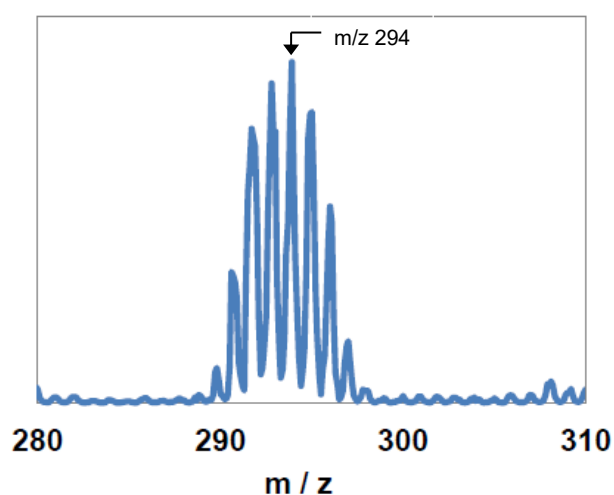


Figure 3. Mass spectrum of a byproduct (retention time, 9.7 min) at 30 h in H-D exchange reaction of ED with Pt/C (ED, 10 mg (0.033 μ mol); 5%Pt/C, 2.0 mg; D₂O, 2.0 mL; H₂ atmosphere; temp., 180°C).

から、ED- d_n の分解物である可能性が高いと判断した。

LC-MSによる一連の測定結果から、EDのMSスペクトルが確認できるため、式1によりEDの重水素化率を算出し、反応時間ごとの推移を表4に示した。

Table 4. Time-course of deuterium efficiency in H-D exchange reaction of ED with Pt/C^a

Solvent	Temp., °C	Time, h	D ^b , %
D ₂ O	180	6	68
		12	62
		18	65
		24	68
		30	68

^a ED, 10 mg (33 μ mol); 5% Pt/C, 2.0 mg; D₂O, 2.0 mL; under H₂ atmosphere. ^b Deuterium efficiencies were calculated by Eq. 1.

表4から重水素化率は反応時間6-30 hにわたりほとんど変動していないことがわかる。このことからEDのH-D交換反応は6時間で反応は終了し、以降反応を継続してもH-D交換反応は進行せず、その後はED- d_n の分解反応が進行すると判断した。これはEDのD₂Oへの溶解性の低さが原因と思われる。すなわちEDはD₂O中で会合体を形成しており、その会合体の表面に存在するEDのみが不均一触媒である5% Pt/Cと反応し、H-D交換を進める。ゆえに、会合体の内部に埋もれたEDは反応できないと推測した。この挙動は先に報告したエクトインのH-D交換反応とは対照的である。エクトインの場合は溶媒であるD₂Oに易溶であったため、反応の進行に伴い、H-D交換反応をしていない原料成分は減少し、最終的に完全に認められなくなった(堤内, 2019)。

本研究で合成する重水素化エボジアミンはLC-MS/MSによるEDの定量分析において内部標準物質として用いることを想定しているため、分析対象であるEDが残存してしまうのは好ましくない。そこで本研究では、均一系でH-D交換反応を行うことができることを目指して、重水素化メタノール(CD₃OD)を用いて同様の反応を行った。しかし、その結果、得られた生成物のLC-MS

測定の結果は ED が単に回収されたのみで、H-D 交換反応は全く進まなかったことを示していた。

なお、本実験で得られた ED- d_n は未反応の ED を含むものの LC-MS/MS による ED の定量分析における内部標準物質として利用することができる可能性がある。そのことを検討するため、この後の実験では収量の確保を目的として、ED は 15 mg (0.050 μ mol), 反応時間は 24 時間行うこととした。そして、分取 HPLC により ED- d_n の単離精製を行ない、実験に用いた。

3-2. NMR を用いた ED- d_n の構造解析

一般に Pt/C ではベンゼン環上の H 原子が活発に交換するとされているが (Ito, 2008), 前述の MS スペクトルの結果を見る限り、ベンゼン環上以外の H 原子も交換し

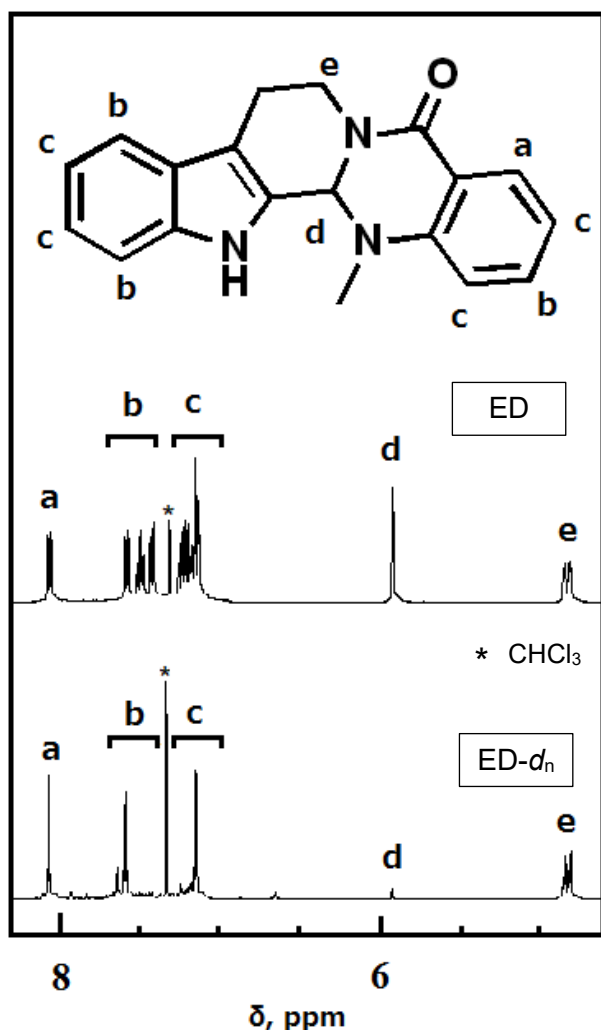


Figure 4. ^1H -NMR spectra of ED and ED- d_n (Solv., $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ (1:1); temp., 25°C ; ref., tetramethylsilane; 400 MHz).

ていると思われる。ゆえに、精製した ED- d_n を用いて NMR 測定を行うことで、ED のどの部分が活発に H-D 交換していたのかを明らかにした。測定結果を図4に示した。最も反応していないと思われるピーク e の積分値がほぼ同じとなるよう表示されている。ED と ED- d_n でピーク a-d のいずれもピーク面積が低下していることからこれらの位置で H-D 交換反応が進行したことがわかった。図4のピーク e のメチレンにおいて H-D 交換反応が全く進行しなかったと仮定した場合、これらの積分値から算出した部位ごとの D 化率を図5に示した。なお、N- CH_3 とインドール環に隣接したメチレン基のピークはほとんど変化しなかった。また N-H に関しては活性プロトンであることから評価の対象外とした。

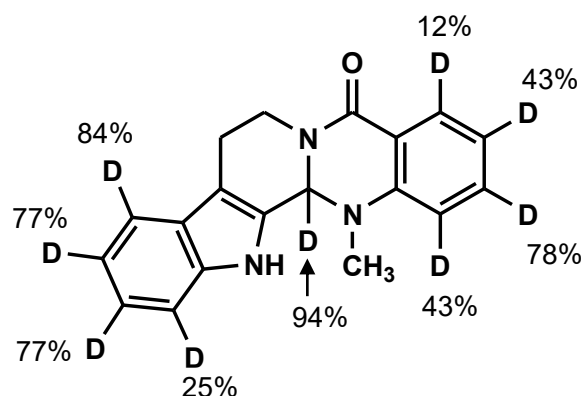


Figure 5. Deuterium efficiency at each position of ED- d_n in H-D exchange reaction with Pt/C (ED, 15 mg (0.050 μ mol); 5%Pt/C, 2.0 mg; D_2O , 2.0 mL; H_2 atmosphere; temp., 180°C ; time, 24h). The percentages were calculated with peak intensities in ^1H -NMR spectra of ED and ED- d_n on the assumption that CH_2 adjacent to quinazolinone moiety did not react at all.

大変興味深いことに、最も H-D 交換反応が進んでいたのはベンゼン環上の水素原子ではなく、キナゾリジノン部位の2つの N 原子に挟まれたメチン水素であった。ベンゼン環に隣接するメチレン水素は比較的活発に H-D 交換反応することから (Ito, 2008), インドール部位との共役系に挟まれた sp^3 炭素という特殊な環境が高い反応性に繋がった可能性が高いと推測した。ED の H-D 交換反応は初めての試みであることから、これらの結果は学術的に重要な知見であると判断している。

3-3. ED- d_6 を内部標準物質に用いた LC-MS/MS による ED の定量分析

LC-MS/MS 測定では装置により観測しやすいイオンが異なる場合がある。そこで、本研究で用いる装置で、分析条件の最適化を試みた。結果は表3に示した通りである。MS/MS におけるモニターイオンは先行研究では m/z 304 > 134 であったが (Liang, 2018), 本研究では m/z 304 > 161 が最も検出しやすいイオンであった。また、溶離液も既報では 0.1%ギ酸 (FA) 水溶液 + ACN であったが、本研究で水への添加剤を FA から酢酸アンモニウム (AcONH_4)、アンモニア (NH_3) と変えたところ、ピーク面積がそれぞれ 1460, 64100, 1670000 と増大したため、溶離液は 10 mmol/L NH_3 水溶液 + ACN を用いることとした。プレカーサーイオンを ED のプロトン付加体 $[\text{M}+\text{H}]^+$ としていたことを考慮すると、ギ酸水溶液を用いた場合は多価イオンが優先的に生成したと推測される。

ED- d_6 については未反応の ED も含まれているが、検量線用標準試料溶液と分析試料に同じロットの ED- d_6 を用いれば、正確な分析値を求めることができると考え、内部標準物質としての検討を進めた。なお、ED- d_6 の MS スペクトルでは m/z 311 のピークが最も大きかったことから、このイオンを MS/MS 測定し、モニタリングイオンとして m/z 311 > 164 を用いることとした。

標準試料溶液では ED- d_6 が 500 ng/mL となるように添加し、表3の条件で LC-MS/MS 測定した。得られた検量線を図6に示した。

図6からわかるように、この検量線では ED 濃度が 0 ng/mL でも内部標準物質と ED とのピーク面積比が 0 とはならない。これは内部標準物質として用いた ED- d_6 の中に ED が含まれているためである。ただ、これと同じロットの ED- d_6 を用いればこの検量線で正確な定量値を得ることができるはずである。ちなみに、ED 濃度が 20 ng/mL における分析値の標準偏差の値の 10 倍を定量下限 (LOQ) とした場合、LOQ は 0.26 ng/mL となった。一方、ED- d_6 を添加しなかった標準試料の LC-MS/MS 測定の m/z 304 > 161 のピーク面積から同様に算出した LOQ は 0.80 ng/mL であった。内部標準物質として ED- d_6 を用いたことで、より感度の高い分析が可能となったことが明らかとなった。

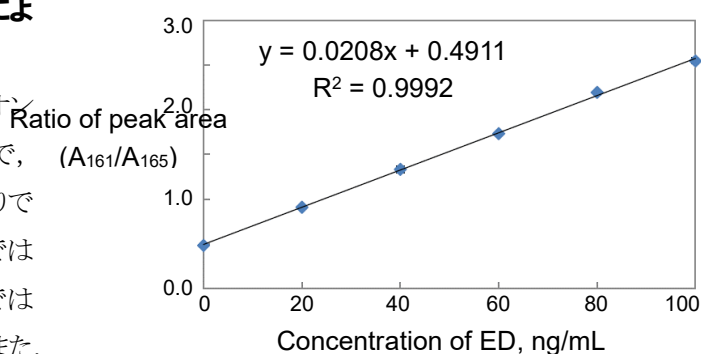


Figure 6. Calibration plot of ED by LC-MS/MS with ED- d_6 as an internal standard (ED- d_6 concentration, 500 ng/mL).

3-4. マウス血清を用いた ED の添加回収実験

測定条件を最適化した LC-MS/MS が実際の生体試料に対して有効であることを確認するため、マウス血清を用いた ED の添加回収実験を行った。ちなみに、先行研究ではマウス血清を 1.0 mL あるいは 200 μL と多量に用いていた (Wen, 2006; Qiu, 2008)。しかし、マウスを用いて ED の作用について研究する際、マウス血清を 200 μL も必要とするのは、貴重な試料の浪費に繋がり、詳細な検討を困難にしてしまう。そこで我々は血清 10 μL でも精度の高い分析値が得られる分析方法の開発を目指した。

本研究では市販品の無い ED の安定同位元素標識化合物を自ら合成できたことから、多少の妨害成分の影響は回避することができる。ゆえに、既報で用いられていた固相抽出法に加え、メタノール (MeOH) + クロロホルム (CHCl_3) 混合溶媒 (1:1) 添加による除タンパクのみの溶媒抽出法も検討した。ED 添加量を 250 あるいは 500 ng/mL とし実験を行ったところ、マウス血清 10 μL では既報に準じた固相抽出法では回収率が 100% を大幅に超えてしまったのに対し、溶媒抽出法ではそれぞれ 95% および 89% と良好な回収率を示した。

そこでさらに添加量を少なくして ED の添加量を 20, 40, 60, 80, 100 ng/mL とし再度回収実験を行った。結果を図7に示した。最も添加量の少ない 20 ng/mL の試料でも 100% 近い回収率を示し、またその標準偏差は小さく抑えられていた。これらの結果はマウス血清 10 μL という、少量の試料でも内部標準物質を用いることで精度

の高い定量分析が可能であることを示している。

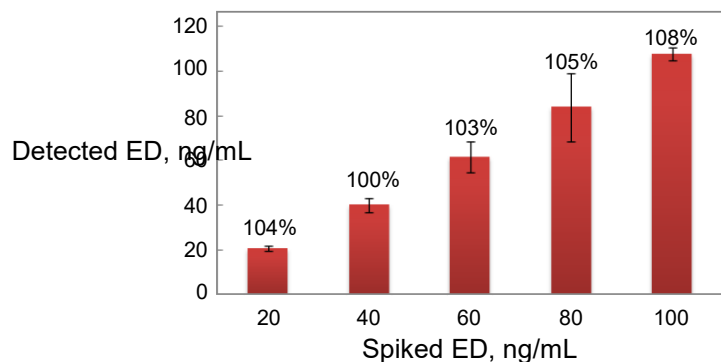


Figure 7. Results of recovery test of ED spiked to mouse serum. The percentage of ED recovery was shown above each ED bar.

4. おわりに

本研究では、ED の体内動態や生物活性調査に有用な安定同位元素標識化合物を合成するため、Pt/C 触媒を重水中水素雰囲気下で用いる H-D 交換反応を行った。反応は既報で述べられていたように進行したものの、水に不溶な ED の性質が影響して不均一に進行し、未反応生成物の残留を解決することはできなかった。一方、得られた ED-*d*₄ を用いてマウス血清中の ED を定量したところ、既報よりも少ない試料量、簡便な前処理方法で高感度に定量できることが明らかとなった。

5. 謝辞

本研究は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「生活習慣病予防の科学的食育プログラム確立を目指す基礎栄養科学研究拠点形成」(2012-2016)の支援を受けて遂行された。

引用文献

- Chiou, W. F., Chou, C. J., Shum, A. Y., and Chen, C. F. 1992. The vasorelaxant effect of evodiamine in rat isolated mesenteric arteries: Mode of action, *European Journal of Pharmacology*. 215: 277-283.
- Desiderio, D. M., Zhu, X. 1998. Quantitative analysis of methionine enkephalin and β -endorphin in the pituitary

by liquid secondary ion mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 794: 85-96.

- Fang, Z., Tang, Y., Ying, J., Tang, C., and Wang, Q. 2020. Traditional Chinese medicine for anti-Alzheimer's disease: berberine and evodiamine from *Evodia rutaecarpa*, *Chinese Medicine*. 15: 82.
- Heo, S. K., Yun, H. J., Yi, H. S., Noh, E. K., and Park, S. D. 2009. Evodiamine and rutaecarpine inhibit migration by LIGHT via suppression of NADPH oxidase activation, *Journal of Cellular Biochemistry*. 107: 123-133.
- Ito, N., Esaki, H., Maesawa, T., Imamiya, E., Maegawa, T., Sajiki, H. 2008. Efficient and selective Pt/C-catalyzed H-D exchange reaction of aromatic rings, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 81: 278-286.
- Kanemitsu, Y., Mishima, E., Maekawa, M., Matsumoto, Y., Saigusa, D., Yamaguchi, H., Ogura, J., Tsukamoto, H., Tomioka, Y., Abe, T., and Mano, N. 2019. Comprehensive and semiquantitative analysis of carboxylcontaining metabolites related to gut microbiota on chronic kidney disease using 2-picolylamine isotopic labeling LC-MS/MS, *Scientific Reports*, 9: 19075.
- Kobayashi, Y., Nakano, Y., Kizaki, M., Hoshikuma, K., Yokoo, Y., and Kamiya, T. 2001. Capsaicin-like anti-obese activities of evodiamine from fruits of *Evodia rutaecarpa*, a vanilloid receptor agonist, *Planta Medica*, 67: 628-633.
- Li, L., Zhang, C., Huang, C., Tian, X., Sun, W., and Jiang, S. 2022. Research advances in antitumor mechanism of evodiamine, *Journal of Chemistry*, 2022: 2784257.
- Liang, S., Zeng, Y., Wu, J., Li, Z., Luo, H., and Wu, Z. 2018.

- Development and validation of a rapid and specific UHPLC–MS/MS method for simultaneous determination of 21 bioactive components in Tiantai No. 1 pill and rat plasma, *Chromatographia*, 81: 447-456.
- Lide, D. R. 2002. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 83rd Edition, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Luo, C., Ai, J., Ren, E., Li, J., Feng, C., Li, X., and Luo, X. 2021. Research progress on evodiamine, a bioactive alkaloid of *Evodiae fructus*: Focus on its anti-cancer activity and bioavailability (Review), *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22: 1327.
- Qiu, P., Chen, X., Chen, X., Lin, L., Ai, C. 2008. Simultaneous determination of five toxic alkaloids in body fluids by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 875: 471-477.
- Takada, Y., Kobayashi, Y., and Aggarwal, B. B. 2005. Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF-kappaB activation by inhibiting IkappaBalpha kinase activation, thereby suppressing NF-kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion, *Journal of Biological Chemistry*, 280: 17203-17212.
- Wang, Y., Kimura, K., Inokuma, K., Saito, M., Kontani, Y., Kobayashi, Y., Mori, N., Yamashita, H. 2006. Potential contribution of vasoconstriction to suppression of heat loss and homeothermic regulation in UCP1-deficient mice, *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 452: 363-369.
- Wen, D., Li, C., Liu, Y., Liao, Y. 2006. Determination of evodiamine and ruteicarpine in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385: 1075-1081.
- Yamashita, H., Kusudo, T., Takeuchi, T., Qiao, S., Tsutsumiuchi, K., Wang, T., and Wang, Y. 2015. Dietary supplementation with evodiamine prevents obesity and improves insulin resistance in ageing mice, *Journal of Functional Foods*, 19: 320-329.
- 佐治木弘尚. 2013. 不均一系白金族触媒的 C-H 活性化に基づく重水素標識化法の開発, *薬学雑誌*, 133: 1177-1193.
- 堤内要, 佐々木雅史, 三浦章寛, 早川優希, 金政真. 2019. エクトインの重水素化による安定同位元素標識化合物の調製, *生物機能開発研究所紀要*, 19: 87-93.
- Title** : Synthesis of deuterated evodiamine and its application for determination of evodiamine by LC/MS/MS
- Authors** : Kaname Tsutsumiuchi¹⁾, Shogo Hirano¹⁾, Hitoshi Yamashita²⁾
- Addresses** : ¹⁾ College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.
²⁾ College of Life and Health Sciences, Chubu University.
- Keywords** : Evodiamine, Stable isotopes, H-D exchange reaction, LC-MS/MS, *Tetradium ruticarpum*

Summary

Synthesis of deuterated evodiamine and its application for determination of evodiamine by LC-MS/MS

Kaname Tsutsumiuchi¹⁾, Shogo Hirano¹⁾, Hitoshi Yamashita²⁾

1) College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

2) College of Life and Health Sciences, Chubu University.

Stable isotopes are useful as internal standards for quantification of compounds in biological samples by LC-MS/MS. However, those are very expensive and not commercially available for many substances such as natural products. Recently H-D exchange reaction on aromatic rings was developed with Pt/C catalyst in D₂O under H₂ atmosphere. We expected that this reaction would afford us a lot of stable isotopes with complex molecular structures. In this study, we synthesized stable isotopes of evodiamine by the H-D exchange reaction with Pt/C. The products contained many stable isotopes with a different number of deuterium and unreacted evodiamine. We applied this product for an internal standard to determine evodiamine in mouse serum by LC-MS/MS. Consequently, deuterated evodiamine contributed to enhancing sensitivity and reliability in the quantification of evodiamine by LC-MS/MS.