薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
103 (9) 967-973 (1983)

4-ブロモメチル-7-メトキシクマリンにより蛍光標識化された 5-フルオロウラシル
およびピリミジンヌクレオシド類の高速液体クロマトグラフィーへの応用

岩本真樹, 吉田 滋, 長 敏夫, 廣瀬信吾
京都薬科大学

Labeling of 5-Fluorouracil and Pyrimidine Nucleosides with 4-Bromomethyl-
7-methoxycoumarin for Fluorimetric Detection in
High Performance Liquid Chromatography

MASAKI IWAMOTO, SHIGERU YOSHIDA, TOSHIO CHOW, and SHINGO HIROSE
Kyoto College of Pharmacy, 5, Nakauchi-cho,
Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto

(Received April 30, 1983)

A method for the labeling of 5-fluorouracil (5-FU) and four pyrimidine nucleosides (uridine, deoxyuridine, fluorodeoxyuridine and thymidine) with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin (Br-Mmc) using 18-crown-6 as a catalyst is described. The fluorescent derivatives are prepared by adding 5.0 mg of Br-Mmc, 1.0 mg of 18-crown-6 and 25 mg of potassium carbonate to a solution containing 0.5 mg of pyrimidine compounds in 20 ml acetone. The mixture is refluxed for 30 min at 75°C. The excess Br-Mmc is treated with *n*-valeric acid after completion of the reaction. High performance liquid chromatographic separation of these fluorescence derivatives have been obtained on a 25 cm column packed with octadecylsilica. The amount of the derivatives is linearly related to the amount of the starting 5-FU and pyrimidine compounds and the procedure can therefore be used in the quantitative analysis. The procedure is simple and requires little or no experience in derivatization techniques. The detection limits of 5-FU, uridine, deoxyuridine, fluorodeoxyuridine and thymidine are 2.5 pg, 5.0 pg, 50 pg, 50 pg and 75 pg, respectively. The structures of the fluorescence derivatives are also discussed from the results of thin layer chromatography.

Keywords—5-fluorouracil; pyrimidine nucleoside; 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin; 18-crown-6; fluorescent labeling; HPLC

5-フルオロウラシル (5-FU) は現在抗腫瘍薬として最も多く用いられている薬物の1つであり、20年以上の歴史をもつ。この5-FUの代謝物に関して、広範な研究がすすめられてきており、その作用機序を説明している重要な文献もみられる。^{1,2)} その結果、現段階では5-FU代謝物であるフルオロデオキシウリジンモノホスフェートとチミジンモノホスフェートシンセターゼとの結合および5-FUのリボ核酸 (RNA) 中への取り込みによる核酸合成の障害がこの制癌剤の主要な作用機序であるという説が支配的となっている。しかし5-FUのピリミジン代謝系路へのより詳細な検討が望まれているのが現状である。

5-FU およびその代謝物の定量法に関して、多くの報告が提出されている。Clarkson ら³⁾は微生物学的検出法により5-FU およびその代謝物を測定しており、さらにMyers ら⁴⁾は酵素学的手段により代謝物の定量を試みている。しかしこれらの方法はいずれも操作の煩雑さや再現性、感度および測定時間の面で多くの欠点を有している。一方5-FUの代謝物のガスクロマトグラフ (GC) への応用は1970年代初期から始められ、^{5,6)} 当初は5-FUの検出限界が0.5 µg/ml 以上で測定感度が非常に悪かった。それ以後改良が加えられ Leenheer ら⁷⁾により尿中で10 ng/ml まで測定可能な程度に感度が上昇した。さらに近年目覚ましい発展を遂げているガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) を使用することにより Wu ら⁸⁾は5-FU に関し血漿中1 ng/ml という高感度検出を可能にした。しかし、内部標準物質として¹⁵N-5-FU を用いていることや GC-MS は現在なお非常に高価な機器であることなどからその一般的な応用性には問題点が残されている。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は GC-MS に比較しより一般的に用いられていると共に分離定量の手段としてもすぐれているため 5-FU 関連化合物への応用も多い。これらの応用において検出器としては紫外外部吸収 (UV) 検出器が圧倒的に多く用いられており, Wu ら⁹⁾は絶対量 5 ng 程度の 5-FU を, また Au ら¹⁰⁾は血漿中約 20 ng/ml まで測定可能であると報告している。しかしこれらの検出感度は 5-FU 関連化合物のモル吸光係数から考えても紫外外部吸収を利用する際の検出限界に近いと考えられる。一方, HPLC による高感度分析には蛍光検出が最適と考えられる。核酸成分の蛍光検出に関する報告として, 吉岡, 田村ら¹¹⁾はクロルアセトアルデヒドを用いアデニン類を蛍光測定している他, プリン系の化合物には蛍光を検出手段として用いている例¹²⁾が少なくない。しかしピリミジン系核酸成分に関してはシトシンがアデニン同様クロルアセトアルデヒドにより発蛍光物質に誘導体化されている¹³⁾以外蛍光ラベル化剤の適用はあまり認められない。今回著者らは, フェニトインやバルビタールなどイミド構造を有する化合物がヨウ化メチルやペンタフルオロベンジルブロマイド (PFB-Br) によりアルキル化されること,^{14,15)} さらにウラシルやチミン等のピリミジン核にも同様のイミド構造を有することなどを利用して 5-FU およびその関連化合物の蛍光ラベル化を試みた。蛍光ラベル化剤としては従来よりカルボン酸用の蛍光ラベル化剤¹⁶⁾として知られている 4-ブロモメチル-7-メトキシクマリン (Br-Mmc) を用いてピリミジン塩基誘導体の蛍光ラベル化を試みた。Br-Mmc は脂肪酸類に対する反応性は容易であるがピリミジン核はそれに比較し反応性に乏しいため反応条件の検討が問題になってくる。そこで著者らはラベル化反応の至適条件, HPLC への応用および蛍光ラベル化体に関する考察を試み, これらの基礎的条件の検討手段としてフルオロウラシル (5-FU), ウリジン (Urd), デオキシウリジン (dUrd), フルオロデオキシウリジン (FdUrd) およびチミジン (Tdr) の Br-Mmc による誘導体化を試みた。さらにこれらのラベル化誘導体の構造を推定するためにウラシル (Ura), チミン (Thy) への Br-Mmc の適用をも検討した。その結果 Ura 等のピリミジン塩基には 2 種のラベル化誘導体が, またそれらのヌクレオシド類には 1 種の誘導体が生成することがわかった。

実 験 の 部

試薬 Thy, Urd, dUrd, Tdr は興人(株)から購入した。18-クラウン-6 ($C_{12}H_{24}O_6$) は日本曹達の 1 級試薬を使用。Br-Mmc, メタノール, Ura, 5-FU, FdUrd, *n*-吉草酸およびその他の試薬は全て試薬特級を用いた。

測定装置および分離条件 HPLC の装置には島津社製 LC-4A を用い, 検出器として同社の蛍光スペクトロモニタ, RF-530 を使用し励起波長 360 nm, 蛍光波長 410 nm で測定した。また, ラベル化剤に対して未反応の Tdr 測定用に同社の紫外外部検出器, SPD-2AS (265 nm) を用いた。分離カラムは島津ステンレス管 FCE-04E (4φ×200 mm) に Nucleosil 5 C₁₈ (Nagel 社製 粒子径 5 μm) をスラリー法により充填したものを使用した。レコーダーには日本電子科学社製 Unicorder U-228 を用いた。

高速液体クロマトグラフィーによる分離条件は移動相として最初 54 v/v% MeOH-H₂O を用い, 試料注入 20 分後に 65 v/v% MeOH-H₂O にステップワイズに切りかえた。流速は 0.6 ml/min で行った。ラベル化体に対し未反応の Tdr を紫外外部で測定する際には, 10 v/v% MeOH-H₂O で流速 0.65 ml/min の条件を用いた。

蛍光ラベル化法 5-FU, Urd, dUrd, FdUrd および Tdr の各々 0.5 mg をアセトン 20 ml に溶解させたのち, モル比にして概略 10 倍の Br-Mmc, 2 倍の 18-クラウン-6 および K₂CO₃ 微粉末 25 mg を加え 75°C で 30 分間還流させ, 反応を完結させた。その後, *n*-吉草酸 0.2 ml を添加し 5 分間さらに還流を続けて未反応の Br-Mmc を全て *n*-吉草酸エステルとした。薄層クロマトグラフにはこの試料液の 2—3 μl を直接適用し, HPLC には試料液をアセトンで 10²—10⁵ 倍に希釈したものを用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) 薄層は市販品 Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck 社製) を用い, 検出器には入江製作所製 Super-light を使用した。ラベル化体は 360 nm で励起される蛍光性のスポットから, また未反応の 5-FU, Urd, dUrd, FdUrd および Tdr は 254 nm で生じる各スポットから R_f 値を求め, 定量的な反応の進行に関する考察を行った。展開溶媒として酢酸エチル:メタノール:10% ギ酸=9:1:1 (v/v) および酢酸エチルの 2 種を用いた。

結 果 と 考 察

蛍光ラベル化剤添加量の検討

フェノールやカルボン酸, イミド類などの酸性物質のハロゲン化アルキルによるアルキル化は, GC の分野においてしばしば用いられる誘導体化法の 1 つである。¹⁷⁾ この基本的な考え方は HPLC の分離にも応用されており,

カルボン酸の蛍光ラベル化剤である Br-Mmc もその一例である。イミド類がカルボン酸と類似の反応性¹⁸⁾をもつとすれば Ura, Thy 類のイミド構造もカルボン酸に対する条件と似た状態で反応し発蛍光性物質へ誘導し得ると考えられる。しかしイミド類はカルボン酸に比較してハロゲン化アルキルとの反応性は乏しいため、定量的に反応が進行しうる条件を設定することが必要となる。Br-Mmc と 5-FU, Urd, dUrd, FdUrd および Tdr の反応を予試験的に行い、反応性に関する検討を TLC で行った結果 Tdr が最も誘導体化されにくいことが判った。このため Tdr が定量的に誘導体化される条件を設定すれば他の化合物にも適用できると考え、以下 Tdr に関しその反応性と条件を検討した。なお、その検討に当って、反応の定量性、未反応原料の存在および副反応生成物などに特に留意し、TLC と HPLC の 2 種の分析手段によりそれらの挙動を確かめながら実験を進めた。

ラベル化剤の濃度が高い程、反応速度は速くなるが、ラベル化剤のピークによる妨害が問題となる。またラベル化剤の添加量を少なくすると反応時間が長くなるため、Br-Mmc に起因する分解産物のピークが多くなり目的とするピークの同定に支障をきたす。したがってラベル化剤の添加量をできるだけ低くおさえ、しかも短時間に反応が完結する条件が要求される。Fig. 1 にラベル化剤の添加量に対する反応の進行の割合を経時的に示した。Tdr に対してモル比で 3, 5 および 10 倍の Br-Mmc を加えた場合、反応開始後 2 時間以内はラベル化剤の添加量が多い程反応の進行も速いがそれ以後大きな変化は認められない。10 倍量の Br-Mmc を加えた場合でも反応が完結するためには 3 時間以上も要した。このためラベル化剤の添加量を 15 倍以上にすることを試みたがラベル化剤によるピークの妨害の問題がでてきたため、Br-Mmc はモル比が 10 倍になるように加え、他の条件を操作して、より短時間で定量的に反応を進行させることを試みた。

触媒添加量の検討

Tdr に対してモル比で 10 倍の Br-Mmc を加えた条件でも反応時間が 3 時間以上になると分解産物のピークが目立ち始め、さらに操作的な面からも実用的でなくなってくる。Lam ら¹⁹⁾は脂肪酸の Br-Mmc によるラベル化に際してクラウンエーテルを用いることにより、反応の迅速化に成功している。この方法はピリミジン誘導体に応用することも充分可能であると考えられ、その検討を試みた。クラウンエーテルは相間移動触媒としてテトラアルキルアンモニウムと並び GC の分野でのアルキル化にしばしば用いられている。¹⁷⁾ その作用はクラウンエーテルが金属イオンとコンプレックスをつくり、ネードアニオン生成を高めることにより反応を触媒する²⁰⁾ものであると考えられており、カルボン酸のフェナシル化²¹⁾等にも使用した例がある。これらの誘導体化に際しては炭酸カリウムが用いられている。クラウンエーテルはその環の大きさと金属イオン半径との間に相関性があることが知られており、カリウムイオンと最も親和性の高い 18-クラウン-6 を使用することにした。²⁰⁾ この際、炭酸

Fig. 1. Effect of Br-Mmc Concentration on Fluorescent Derivative Formation

Each 0.5 mg of Tdr was dissolved in 20 ml of three different concentration of Br-Mmc solution.

- [Br-Mmc]/[Tdr]=3,
- [Br-Mmc]/[Tdr]=5,
- △—△ [Br-Mmc]/[Tdr]=10.

Fig. 2. Effect of 18-Crown-6 Concentration on Fluorescent Derivative Formation

Each 0.5 mg of Tdr and 5.0 mg of Br-Mmc was dissolved in 20 ml of five different concentrations of 18-crown-6 solution.

- =[18-crown-6]/[Br-Mmc]=0, ●—●=0.05,
- ▲—▲=0.10, △—△=0.20, ×—×=1.0.

カリウムの量は Grushka ら²²⁾の考察に従ってピリミジン誘導体や 18-クラウン-6 に対して大過剰に加えることにした。Fig. 2 は触媒量と反応の進行の割合の関係を経時的に表したものであり、触媒量は Br-Mmc に対するモル比 ([18-crown-6]/[Br-Mmc]) で示している。Fig. 2 によればクラウンエーテルの触媒作用は非常に有効であり、その添加量の増加と共にラベル化反応を著しく促進していることが判る。これらの事実はラベル化剤の添加量の増加を検討するよりもはるかに有効な手段であることを示している。しかし触媒を添加する場合の欠点として触媒量の増加に伴い Br-Mmc の分解産物のピークも増大するという結果が現れた。これらのピークの保持時間はヌクレオシド類の誘導体のそれに類似しており、定量の際に大きな妨害となるためクラウンエーテルのラベル化剤に対する最適比を 1/5 とした。以上の結果、クラウンエーテルを触媒として加えない場合、反応完結に 3 時間以上も要したのに対し、これを添加することにより 1 時間以内で完結可能な状態にまで条件を改善することができた。

反応温度による影響

Grushka ら²²⁾は Br-Mmc によるジカルボン酸のラベル化反応を行う際、80—90°C で 1 時間還流という条件を用いている。著者らのラベル化剤添加量および触媒添加量に関する検討は 65°C で行っていたため、この反応温度を変えることによって反応をさらに促進させることを試みた。温度以外の各条件を全て同一として反応温度を 10 度ずつ変化させた結果を Fig. 3 に示した。温度変化による影響は触媒添加量を変化させた場合と同様に非常に顕著に現れた。すなわち、水浴の温度が 65°C では反応完結に 1 時間の還流が必要であったが 75°C では 30 分以内に、さらに 95°C では 15 分以内に反応が完結することが明らかとなった。またこの反応速度は 70°C 前後で大きく変化することが同時に考察された。しかし、反応温度を 85°C 以上にすると短時間で反応が完結するものの Br-Mmc の分解産物のピークが多く現れ、S/N 比が悪くなるために 75°C が至適反応温度と結論した。以上の実験条件の検討により Br-Mmc によるピリミジン誘導体の蛍光ラベル化反応の最適条件として、Br-Mmc をピリミジン化合物に対しモル比で 10 倍加える、クラウンエーテルを Br-Mmc の 1/5 量添加する、および反応温度を 75°C とすれば良いことが判明した。この結果、触媒を加えないで 65°C で反応を行った場合と比べ、反応時間を 6 倍以上短縮することが可能となった。このような最適条件下で 5-FU, Urd, dUrd, FdUrd について同様のラベル化を行ったところ、全て満足な結果を得ることができた。

HPLC への適用

Br-Mmc は水に対し非常に不安定であり、移動相中の水とさえ反応して分解産物のピークの増大やベースラインの変動が起こることがクロマトグラムの明らかなであった。これらの分解物のピークは蛍光ラベル化されたヌクレオシド類のピークと同様の位置に出るものが多く、検出感度や再現性の劣化の大きな原因になる。したがって過剰の Br-Mmc の除去が必要となり、著者らは *n*-吉草酸により処理することを試みた。*n*-吉草酸の Mmc 誘導体のクロマトグラムを検討した結果、蛍光ラベル化ヌクレオシド類やラベル化 5-FU よりもはるかに保持時

Fig. 3. Effect of Reaction Temperature on Fluorescent Derivative Formation

○—○: 65°C, ●—●: 75°C, ▲—▲: 85°C, △—△: 95°C.

Fig. 4. Time Effect of Derivative Formation of *n*-Valeric Acid

Reaction temperature: 75°C.

間が長いことがわかった, *n*-吉草酸と Br-Mmc との反応の経時的変化を Fig. 4 に示した. Fig. 4 より 5 分間で Br-Mmc は *n*-吉草酸と完全に反応していることが明らかであり, しかも残った過剰の *n*-吉草酸は HPLC による分離に全く影響を及ぼさなかった. 今回の基礎的検討に用いた 5-FU, Urd, dUrd, FdUrd, および Tdr の各々の Br-Mmc による誘導体を HPLC により分離検出したクロマトグラムを Fig. 5 に示した. Fig. 5 において Urd および dUrd の Br-Mmc 誘導体ピークの間には蛍光ラベル化ヌクレオシド類に由来しないピークが現われる. このピークは Br-Mmc のみの測定でも現れ, さらに *n*-吉草酸による処理の有無にかかわらず, その高さに変化がな

Fig. 5. Separation of 5-FU and Pyrimidine Derivatives on a C₁₈ Column

Mobile phase; from 0 to 20 min: 54% methanol, from 25 to 35 min: 65%, from 35 to 45 min: 100%.
Flow rate; 0.6 ml/min.
1: Urd, 2: impurity, 3: dUrd, 4: FdUrd, 5: Tdr, 6: 5-FU, 7: *n*-valeric acid.

Fig. 6. Relationship between Fluorescence Intensity and Amount of Each Pyrimidine Compound

△—△: 5-Fu, ○—○: Urd, ●—●: dUrd, ▲—▲: FdUrd, ×—×: Tdr.

The fluorescent derivatives are prepared by adding 5.0 mg of Br-Mmc, 1.0 mg of 18-crown-6 and 25 mg of potassium carbonate to a solution containing 0.5 mg of pyrimidine compounds in 20 ml acetone.

The solutions are diluted to 100-fold with acetone.

いことからラベル化剤の不純物と考えられる. このピークは dUrd の検出限界を悪くする原因となっており, また今回は検討しなかったがフルオロウリジン (FUrd) の蛍光誘導体もこの付近に現れると推察されるため, これらの検出を妨害することが予想される. したがって, 本法を生体成分の分析に応用する場合には, Br-Mmc を精製することが必須条件となる. 5-FU, Urd, dUrd, FdUrd および Tdr の各蛍光誘導体の検量線を Fig. 6 に示した. 検量線作製に際し, Br-Mmc 5 mg, 18-クラウン-6 を 1 mg および炭酸カリウム 25 mg を含む 20 ml のアセトン中に 5-FU, Urd, dUrd, FdUrd および Tdr をそれぞれ 0.1 mg ずつ, 10 μ g ずつおよび 1 μ g ずつを加え反応させた. 反応後, それぞれの液をアセトンで 100 倍に希釈し HPLC で分離した結果から検量線を得た. 検出限界は S/N 比を 2 とした条件下で 5-FU: 2.5 pg, Urd: 5.0 pg, dUrd: 50 pg, FdUrd: 50 pg, Tdr: 75 pg であった. 5-FU や Urd は 10^3 のオーダーの広い範囲にわたって良好な直線関係が示され, 本法の有用性が示唆されている. ただし Tdr はその蛍光誘導体と同じ位置に Br-Mmc の不純物のピークが現れるために他の誘導体に比較し検出限界が悪くなっている. 紫外外部検出器 (265 nm) でそれぞれの未ラベル化体の検出限界を測定したところ 5-FU: 500 pg, Urd: 1 ng, dUrd: 500 pg, FdUrd: 500 pg および Tdr: 1.5 ng であった. 今回の蛍光誘導体化により感度は 20—250 倍改善された. ヌクレオシド類の検出限界は Br-Mmc の精製によりさらに上げることが可能と思われる.

蛍光ラベル化誘導体に関する考察

TLC および HPLC を利用して各ピリミジン誘導体が Br-Mmc によりラベル化される反応を推定するための検討を行った. Table I にピリミジン誘導体, リボースおよびデオキシリボースを Br-Mmc と反応させ TLC で分離し, 確認されたスポットの数および *R_f* 値を示した. その結果, リボースおよびデオキシリボースは Br-Mmc により誘導体化された蛍光物質のスポットを与えなかった. また Ura, Thy そして 5-FU など塩基由来のものには蛍光物質

が1—2個現れたのに対し、ヌクレオシド系の化合物では全て1つのスポットしか観察されなかった。これらの結果は Br-Mmc が糖部分とでなくピリミジン環と反応していることを示唆している。さらに糖が結合している部位はピリミジン塩基の1位の N 原子であること、またヌクレオシドではその塩基と比べ Br-Mmc 誘導体のスポット数が2から1に減っていることなどから、Br-Mmc は少なくともピリミジン塩基の1位の N 原子とは反応していると推測される。一方、他のピリミジン塩基が2つの蛍光誘導体のスポットを与えるのに対し、5-FU だけが1つのスポットしか与えないという点に関する検討を行った。このため 5-FU と Br-Mmc との互いのモル比を変化させて得られた誘導体のクロマトグラムを Fig. 7 に示した。Fig. 7 によれば Br-Mmc の濃度に対し 5-FU を過剰に加えると他の Ura, Thy と同様2つのピークを与えるが Br-Mmc の濃度を高くするにつれ、保持時間の短いピークが小さく、また長いピークが大きくなり、Br-Mmc が過剰の状態では1つのピークとなってゆく様子が理解される。以上のことからピリミジン塩基と Br-Mmc との反応では2種の化合物が存在すること、Ura と Thy の場合は 5-FU に比較してその反応速度が遅いため2つのピークとして現れることなどがわかった。5-FU が他のピリミジンに比べ反応速度が速い理由は目下検討中である。

次に結合部位に関しさらに検討するために Leenheer ら^{23,24)}がヌクレオシド類を GC で分析する際のアルキル誘導体化に用いた方法を利用した。メチルスルフィニルカルバニオンおよびヨウ化メチルによりこの反応はヌク

TABLE I. TLC Separation of Pyrimidine Derivatives, Ribose and Deoxyribose

Compound	R _f value			
	Solvent I		Solvent II	
Uracil	0.74	0.58	0.48	0.30
Thymine	0.81	0.68	0.57	0.39
5-FU	0.89		0.74	
Uridine	0.30		0.03	
Deoxyuridine	0.40		0.12	
Fluorodeoxyuridine	0.57		0.21	
Thymidine	0.44		0.08	
Ribose	—		—	
Deoxyribose	—		—	

Solvent I; ethyl acetate : methanol : 10% formic acid = 9 : 1 : 1.

Solvent II; ethyl acetate.

Fig. 7. Comparison of Reaction in Three Different Ratios, Br-Mmc and 5-FU

a) [Br-Mmc]/[5-FU]=0.2, b) [Br-Mmc]/[5-FU]=1.0, c) [Br-Mmc]/[5-FU]=20.6.

1, 2: the fluorescent derivatives of 5-FU, 3: the fluorescent derivative of *n*-valeric acid.

Mobile phase; 80% methanol, flow ratio; 0.6 ml/min.

Chart 1

	R ₁	R ₂	R ₃
uridine	H	OH	OCH ₃
deoxyuridine	H	H	H
fluorodeoxyuridine	F	H	H
thymidine	CH ₃	H	H

Chart 2

レオシド類のアルコール性OH基とイミド構造の-NH-基を全てメチル基でふさぎ、しかもほとんど収率が100%でただ1つの誘導体しか与えないことが知られている。このようにアルキル化したピリミジン塩基とヌクレオシド類を Br-Mmc と反応させてみたところ、TLC および HPLC によっても発蛍光性物質の生成は全く認められなかった。ヌクレオシドのピリミジン環がメチル化された位置は3位のN原子のみであり、メチル化によって Br-Mmc と反応しなくなったという事実は Br-Mmc がヌクレオシドの3位のN原子にラベル化されたことを示唆している。したがってヌクレオシド類の Br-Mmc によるラベル化反応は Chart 2 のように示されるのではないかと推定された。このような反応機構は Hulshoff ら¹⁷⁾の理論にもよく一致するところである。今後機器分析などの手段により、詳細な検討を行いたい。

引用文献および注

- 1) C. Heidelberger, "Handbook of Experimental Pharmacology," ed. by A. C. Sartorelli, D. G. Tohns, Springer-Verlag, New York, 1974, p. 193.
- 2) W. L. Washtien, D. V. Santi, *Cancer Res.*, **39**, 3397 (1979).
- 3) B. Clarkson, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **5**, 581 (1964).
- 4) C. E. Myers, R. C. Young, D. G. Johns, B. A. Chabner, *Cancer Res.*, **34**, 2682 (1974).
- 5) J. J. Windheuser, J. L. Sutter, E. Auen, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 301 (1972).
- 6) J. L. Cohen, P. B. Brennan, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 572 (1973).
- 7) A. P. De Leenheer, C. F. Gelijckens, *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 552 (1978).
- 8) A. T. Wu, H. J. Schwandt, C. Finn, W. Sadée, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **14**, 89 (1976).
- 9) A. T. Wu, J. L. Au, W. Sadée, *Cancer Res.*, **38**, 210 (1978).
- 10) J. L. Au, A. T. Wu, M. A. Friedman, W. Sadée, *Cancer Chemother. Rep.*, **63**, 345 (1979).
- 11) Y. Yoshioka, Z. Tamura, *J. Chromatogr.*, **123**, 220 (1976).
- 12) 田和理市, 阿部芳正, 竹島繁雄, 木藤正弘, 廣瀬信吾, 日本薬学会第103年会にて発表, 東京, 1983年, 4月.
- 13) N. N. Kochetkov, V. N. Shibaev, A. A. Kost, *Tetrahedron Lett.*, 1971, 1993.
- 14) A. Wu, M. L. Pearson, *Anal. Lett.*, **10**, 381 (1977).
- 15) T. Walle, *J. Chromatogr.*, **114**, 345 (1975).
- 16) W. Dünge, *Anal. Chem.*, **49**, 442 (1977).
- 17) A. Hulshoff, A. D. Förch, *J. Chromatogr.*, **220**, 275 (1981).
- 18) W. Dünge, N. Seiler, *J. Chromatogr.*, **145**, 483 (1978).
- 19) S. Lam, E. L. Grushka, *J. Chromatogr.*, **158**, 207 (1978).
- 20) 小田良平, 庄野利之, 田伏岩夫編, "化学増刊 クラウンエーテルの化学," 化学同人, 東京, 1978年, p. 115.
- 21) H. D. Durst, M. Milano, E. J. Kikta, Jr., S. A. Connelly, E. Grushka, *Anal. Chem.*, **47**, 1797 (1975).
- 22) E. Grushka, S. Lam, J. Chassin, *Anal. Chem.*, **50**, 1398 (1978).
- 23) A. P. Leenheer, C. F. Gelijckens, *Anal. Chem.*, **48**, 2 03 (1976).
- 24) H. J. Schwandt, A. T. Wu, C. Finn, W. Sadée, "Nucleic Acid Chemistry, Part II," ed. by L. B. Townsend and R. S. Tipson, A Wiley-Interscience Publication, New York, 1978, p. 910.