薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
104 (12) 1251-1256 (1984)

蛍光ラベル化を利用したピリミジン核酸塩基及び 5-フルオロウラシルの
高速液体クロマトグラフィーによる同時定量

岩本真樹,* 吉田 滋, 廣瀬信吾
京都薬科大学

High Performance Liquid Chromatographic Determination of
Pyrimidine Nucleobases and 5-Fluorouracil Labeled by
Fluorescent Reagent

MASAKI IWAMOTO,* SHIGERU YOSHIDA, and SHINGO HIROSE

Kyoto Pharmaceutical University, 5, Nakauchi-cho,
Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto

(Received June 21, 1984)

A rapid fluorescent labeling method of imides with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin (Br-Mmc) is described. Mmc-derivatives of imides are prepared by adding 10 mg of Br-Mmc to a solution containing 1 mg of imides (pyrimidine nucleobases or barbitals) and 10 mg potassium carbonate in 5 ml dimethylsulfoxide (DMSO). The reaction is completed for 5 min at room temperature when Br-Mmc concentration in the mixture is 2 mg/ml. The excess Br-Mmc is treated with *p*-nitrobenzoic acid, which gives Mmc-derivative with no fluorescence. High performance liquid chromatographic separation of Mmc-derivatives of imides are obtained on a C₁₈ column. With this method the reaction time for labeling is dramatically reduced without catalyst such as crown ether. The reaction system is discussed according to donor-acceptor theory.

Keywords—fluorescent labeling; pyrimidine nucleobase; 5-fluorouracil; barbital; 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin; HPLC; imide; dimethylsulfoxide; donor-acceptor

化学療法剤として用いられている 5-フルオロウラシル (5-FU) やそのプロドラッグ [例えば 1-(tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil¹⁾ や 1,3-bis(tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil²⁾] などの血中濃度の測定は臨床診断上重要な課題であり薄層クロマトグラフィー (TLC), 高速液体クロマトグラフィー (HPLC), ガスクロマトグラフィー (GC) 及び GC-mass スペクトロメトリーなどによる方法が試みられている。最近, 藤井ら³⁾ はこれらの薬物とピリミジン塩基であるウラシル (Ura) を 4 : 1 (mol/mol) の割合で同時に経口投与すると薬物を単独で投与するよりずっと有効であり, 癌組織における 5-FU の濃度も高くなることを報告した。さらに彼らは Ura の作用機序を詳細に検討するため 5-FU と Ura の同時微量定量を確立することを試みた。その結果, 逆相系カラムを用いた HPLC やシリル化した後の GC では同時定量が困難であることを明らかにし, 未解決の問題点として残されている。

著者らは前報⁴⁾ において 5-FU やピリミジンヌクレオシド類の定量に際し, そのイミド構造に着目し, 4-ブロモメチル-7-メトキシクマリン (Br-Mmc) で蛍光ラベル化したのち HPLC に適用して高感度に分析することを可能にした。

本報ではこれまで蛍光ラベル化が困難であった Ura やチミン (Thy) を Br-Mmc によりラベル化し, 5-FU と同時に HPLC で分離定量する手段について検討を加えた。この際, 生体試料のルーチン分析法を確立するための基礎的検討を目的として, 試料は既知物質を用いて, 1) 定量的に反応が進行する条件, 2) 反応時間の短縮, 3) 微量試料の処理方法, 4) 過剰の蛍光試薬の後処理法, 5) HPLC での分離などの条件設定を行った。さらにこのラベル化法の妥当性を示すために同様のイミド構造を有するバルビタール (Bar) [内部標準物質: メフォバルビタール (m. Bar)] の定量に応用することを試みた。

実験の部

試薬 Ura, Thy, 5-FU 及び Bar はすべて半井化学から購入した。Br-Mmc は蛍光分析用、メタノール (MeOH) やアセトニトリル (CH_3CN) は HPLC 用のものを使用し、溶媒系を含め他はすべて試薬特級を用いた。

測定装置と分離条件 HPLC は島津社製 LC4A を用い、検出器は同社製蛍光スペクトロモニタ RF-530 (励起波長 360 nm, 蛍光波長 410 nm に設定) を使用した。分離カラムは島津社製ステンレス管 (4 i.d. $\times$ 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。

HPLC 分離条件としては、Ura, Thy 及び 5-FU の分離の際には MeOH : CH_3CN : 水 = 45 : 10 : 45 (v/v), 流速 0.8 ml/min を用い、一方 Bar の検出には MeOH : 水 = 80 : 20 (v/v), 流速 0.6 ml/min を用いた。

蛍光ラベル化法 Ura, Thy, 5-FU または Bar などの目的物質 (1 mg 以下) をジメチルスルホキシド (DMSO) 1 ml に溶解させ、炭酸カリウム微粉末 10 mg を加える。その混液に Br-Mmc 2.5 mg/ml の DMSO 溶液 4 ml を加え、反応時の Br-Mmc 濃度を 2 mg/ml の DMSO 溶液になるように調製する。暗所、室温で 5 分間放置し反応させる。反応完結後、過剰のラベル化剤を *p*-ニトロ安息香酸 (*p*-NBA) 2 mg/ml の DMSO 溶液 5 ml を添加することによって無蛍光化処理をする。HPLC への適用にはこれを直接、または希釈したものを用いた。

TLC 薄層は市販品 Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck 社製) を使用した。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) 及びベンゼン : 酢酸エチル = 5 : 3 (v/v) の 2 種類を用いた。試料溶液をスポットし、上記の 2 種類の溶媒系で展開後風乾した。検出は入江製作所製 Super-light を用い、ラベル化体は 360 nm で励起される蛍光性のスポットから、また未ラベル化体は 254 nm により生じるスポットから *R_f* 値を求め、反応の進行に関する考察を行った。

結果と考察

アルカリの種類に関する検討

イミド類がカルボン酸と同様にアルカリ存在下ハロゲン化アルキルによってアルキル化される反応は GC の分野で確立されており、それが *S_N2* タイプの反応であることは Hulshoff ら⁵⁾ により示されている。このハロゲン化アルキルは HPLC の分野でも利用され、Dünges ら⁶⁾ はカルボン酸用蛍光ラベル化剤としてハロゲン化メチルの 1 個の水素原子を蛍光団により置換した Br-Mmc を開発している。これらの事実から著者らはピリミジン化合物にイミド構造が存在することに着目し Br-Mmc をピリミジン系核酸関連物質の蛍光ラベル化に応用することを試みた。⁴⁾ この際、Dünges⁶⁾ あるいは彼の方法にクラウンエーテルを触媒として導入し改良した Lam ら⁷⁾ の方法では、5-FU やピリミジヌクレオシドなどの反応速度の速いものは Br-Mmc との反応が完結するが、Ura や Thy などの反応速度の遅い核酸塩基類への適用は困難であった。⁴⁾ Lam ら⁷⁾ はアルカリの種類が反応速度に大きく影響することを示しており、著者らもこれに関し検討した。TLC や HPLC の結果より Ura, Thy, 5-FU のうち最も反応速度の遅いことが判明した Thy により条件検討を進めることにした。アルカリには炭酸カリウム (K_2CO_3) の他、カリウムターシャリーブトキシド (*tert*-BuOK) と水酸化カリウム (KOH) を微粉末にして使用した。アルカリの種類以外を全て前報の方法⁴⁾ (溶媒 : アセトン, 触媒 : 18-クラウン-6, 75°C で還流, Fig. 1 参照) に順じて反応させた結果を Fig. 1 に示した。Fig. 1 から

Fig. 1. Effect of Alkali and Br-Mmc Concentration on the Reaction Yield of Thymine-Mmc Derivative

□—□; 0.5 mg of thymine in 20 ml acetone was derivatized with 5 mg of Br-Mmc and 1 mg of 18-crown-6 in the presence of 10 mg of K_2CO_3 powder at 75°C.

×—×; 0.5 mg of thymine in 20 ml acetone was derivatized in the above conditions in the presence of *tert*-BuOK powder.

△—△; 0.5 mg of thymine in 20 ml acetone was derivatized in the above conditions in the presence of KOH powder.

●—●; 1.0 mg of thymine in 5 ml DMSO was derivatized with 5 mg of Br-Mmc in the presence of 10 mg of K_2CO_3 powder at room temperature.

○—○; 1.0 mg of thymine in 5 ml DMSO was derivatized with 10 mg of Br-Mmc in the above conditions.

tert-BuOK や KOH を用いた場合には HPLC のクロマトグラム上に目的ピークは現れず、ラベル化反応は起こらないことが分かった。しかもクロマトグラム上に未知なピークが多く出ることなどから、これらのアルカリを用いた場合 Br-Mmc 自身が分解されると考えられる。⁸⁾ したがってこれらのアルカリの中では K_2CO_3 が最適であると考えられた。しかし Fig. 1 は K_2CO_3 を用いた場合でも 1 時間以内に反応が完結せず実際的でないことを示している。このため K^+ としては K_2CO_3 を用いることとして他の条件を検討することより反応時間の短縮を試みた。

反応溶媒系に関する検討

Br-Mmc によるラベル化反応が S_N2 反応であると考えたとラベル化剤濃度を高めることや非プロトン溶媒の種類を変えること(溶媒効果)により反応速度を速められると推察できる。⁹⁾ しかし溶媒としてアセトンを用いた場合、溶解度が悪く Br-Mmc を 0.5 mg/ml に調製することが濃度的に限界に近い状態であった。さらにアセトン溶媒中では Br-Mmc 濃度を 0.5 mg/ml まで上昇させても反応時間の短縮に及ぼす影響はあまり顕著でなかった。これらの結果は多少の差があるもののアセトニトリル (CH_3CN) や酢酸エチル (AcOEt) 溶媒中でも同様の挙動を示した。

より高い Br-Mmc 濃度を調製でき、また溶媒効果を期待できる非プロトン溶媒として DMSO, *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF), *N,N*-ジメチルアセトアミド (DMA) などを選び検討した結果、有望であることが分かった。これらの溶媒を用いた場合、予想以上に反応速度が速くなり、クラウンエーテル等の触媒無しでも室温で短時間に反応が完結した。DMSO 中でのラベル化剤濃度の変化が反応速度に及ぼす影響を Fig. 1 に同時に示した。すなわち Thy 1 mg を Br-Mmc 濃度がそれぞれ 1 mg/ml または 2 mg/ml の DMSO 溶液 5 ml 中に溶解させ、 K_2CO_3 微粉末 10 mg の存在下室温で放置したところ Br-Mmc 濃度が 2 mg/ml の場合 5 分間で完結し、1 mg/ml でも 10 分間程度で反応が終了した。DMF や DMA を用いた場合も同様に反応速度が速くなることが認められた。このように溶媒を還流させることなく室温放置でラベル化が進行するという事実は生体試料などの微量で希薄なサンプルの取り扱いが可能であることを示しており、ラベル化反応法として適していると考えられる。

これら 3 種の溶媒を用いた際のクロマトグラム上の変化はラベル化剤の分解物の生じ方が異なることであった。DMF や DMA を用いると保持時間のかなり長い部分に溶出してくる分解物が多く、これらのピークが 5-FU や Ura 等のピリミジンヌクレオベースの定量を妨害すると考えられる。したがって 5-FU, Ura 及び Thy の定量には溶媒として DMSO が最適であることが分かった。しかし DMSO は凝固点が $18^\circ C$ と高いため室温がそれ以下になると操作性に欠点を有した。したがって、もし目的物質のラベル化体の保持時間が Br-Mmc の分解物より長い場合は DMF や DMA を使うことが望ましいと結論された。

反応機構に関する考察

従来 Br-Mmc によるラベル化反応はアセトンや酢酸エチルなどの非プロトン系溶媒中で行われるのが通例であった。⁹⁾ しかしアセトン、 CH_3CN や AcOEt を用いたときの還流法と DMSO, DMF や DMA などの溶媒を用いた室温放置によるラベル化法では後者が飛躍的にその反応性が高く、単なる濃度的なパラメーターだけでは説明が付き難い。Hulshoff ら⁹⁾ は S_N2 反応に用いられる溶媒は非プロトン性だけでなく、生成イオンを溶媒和する能力が必要なことを述べている。一方 Gutmann ら¹⁰⁾ は溶液反応の分子間作用に Lewis の酸、塩基説を拡張させた donor-acceptor の理論を適用させている。即ち各溶媒に対し電子供与性及び電子受容性の強さを示すパラメーターとしてそれぞれ donor number (DN)

と acceptor number (AN) を設定し、イオンの溶媒和とそれによる化学反応性の検討に利用している。本報でのラベル化法に donor-acceptor の理論を適用し、反応性を考察するため各溶媒系及びそれらの DN と AN を Table I に示した。Table I から各溶媒の AN がほぼ類似していることが分かる。このことは各溶媒のアニオンに対する溶媒和、即ち安定化の度合いが同程度であることを意味する。⁹⁾ 一方、DN はアセトン、 CH_3CN , AcOEt のグループと DMSO,

TABLE I. Donor Number and Acceptor Number of Each Solvent

	DN	AN
Acetone	17.0	12.5
CH_3CN	14.1	19.3
AcOEt	17.1	
DMSO	29.8	19.3
DMF	26.6	16.0
DMA	27.8	13.6

Fig. 2. Effect of Solvated Ion

DMF, DMA のグループに分かれ後者の値の方が大きい。これは後者のグループの方がカチオンをより溶媒和することを意味している。以上の検討を本法の反応機構に適用したものを Fig. 2 に示した。Fig. 2 (1) はアセトンなどの溶媒系を用いた場合の溶媒和の状態を表したもので Fig. 2 (2) はそれらの溶媒系にラベル化反応の触媒としてクラウンエーテルを関与させた状態である。18-クラウン-6 の環の大き

さがカリウムイオンの半径とホスト-ゲストの関係にあり、コンプレックス形成からネードアニオンが促進されている。¹⁰⁾ 即ち Fig. 2 (2) は Fig. 2 (1) の構造に比べアニオンとの反応性が増加しているため反応が促進されると解釈できる。¹¹⁾ Fig. 2 (3) は DMSO, DMF 及び DMA などの溶媒を用いた場合の溶媒和の状態を示している。これらの溶媒系では DN の値が高いため対イオンであるカリウムイオンを強く溶媒和し、結果的にクラウンエーテルを用いた Fig. 2 (2) の場合と同様にネードアニオンを形成するのに役立っていると考えられる。これらの理由とラベル化剤の濃度を高めたことが相乗的に作用してイミド化合物と Br-Mmc との反応性が飛躍的に増加したものと考えている。なお、前報⁴⁾ でのピリミジン誘導体と Br-Mmc との反応機構の考察をもとに Chart 1 に示す式が結論的に考えられた。

Chart 1

過剰ラベル化剤の処理法

Br-Mmc は K₂CO₃ 存在下 DMSO, DMF または DMA 中で不安定となり分解物を生じる。また過剰の Br-Mmc は HPLC に適用した場合、移動相中の水とも反応して分解することを確認している。⁴⁾ これらのピークは目的物質の同定を困難にしたり検出限界の劣化につながる可能性があるため、目的物質のラベル化が完了した後直ちに過剰の Br-Mmc を処理する必要がある以下その方法に関し検討した。

(I) *n*-吉草酸を用いる方法 過剰の Br-Mmc を *n*-吉草酸のエステルとして安定化させる方法で、その保持時間 (9.2 分: 80 v/v% MeOH/H₂O, 流速 0.6 ml/min) は核酸塩基の Mmc 誘導体よりも長く定量を妨害しない。⁴⁾ 操作法としては、目的物質のラベル化反応が完結した DMSO 溶液 5 ml に *n*-吉草酸 0.2 ml を加え室温で 5 分間放置した。この方法は簡潔でしかも単時間に Br-Mmc の処理ができる有用性がある。しかし目的物質が *n*-吉草酸と類似の保持時間を有する場合には適用できない欠点がある。

(II) アミノフェノールによる抽出除去法 ペンタフルオロベンジルブロマイド (PFB-Br) を用いて脂肪酸を誘導化、定量する際に、過剰の PFB-Br をアミノフェノールの一種であるホルデニンを用いて抽出除去する方法が知られている。¹²⁾ PFB-Br と Br-Mmc との構造類似性からその方法を Br-Mmc 除去に応用することを考えた。操作法としては、ラベル化反応の終わったサンプル溶液 5 ml にジクロロメタン (CH₂Cl₂) 10 ml を添加、これに 0.1 M 硫酸テトラブチルアンモニウム (0.1 M NaOH 水溶液中) 10 ml を加え 25 分間振とうした。その後、0.5 M 硫酸ホルデニン (1 M NaOH 水溶液) 10 ml を加えさらに 45 分間振とうした。この操作により過剰の Br-

Mmc はすべて水層に移り 5-FU 等の Mmc ラベル化体は有機層に残る. この方法は過剰の Br-Mmc の影響をほとんど除く事を可能にしたが操作が煩雑なことや水層に移行しない化合物にしか適用できない欠点を有している.

(III) *p*-NBA による無蛍光化 蛍光ラベル化試薬である Br-Mmc により誘導化されたにもかかわらずその発蛍光性を失う化合物がいくつか知られている.¹⁸⁾ 著者らは *p*-NBA の Mmc 誘導体が無蛍光性であることに着目し, 過剰の Br-Mmc を *p*-NBA により処理することを考えた. 操作法としては, ラベル化反応後のサンプル溶液に *p*-NBA 2 mg/ml DMSO を 5 ml 添加し室温で 5 分間放置した. この処理により過剰の Br-Mmc は発蛍光性を失い検出されなくなった. クロマトグラムは平坦で妨害を示さずしかも操作法も簡単であるため, この処理法は目的物質の極性にかかわらず応用でき一般的な使用に耐え得ることが分かった.

過剰の Br-Mmc の処理対策は可能になったがラベル化反応中にも Br-Mmc は分解し, ピークを生じる. しかしラベル化に要する反応時間は 5 分間と短いためピーク高さも小さく現れる. したがって定量目的物質がピリミジン核酸塩基やバルビタールなどの逆相系で保持時間が長いものは HPLC のキャリアー溶媒の検討により分離することが可能であった. またヌクレオシド等の保持時間の短い物質に関してはあらかじめ TLC で分離し目的部分のみを切り取り, 抽出後 HPLC に適用すれば好結果が得られることは既に確認している.^{14,15)}

HPLC への応用

以上の検討をもとにして, Ura, Thy 及び 5-FU を Br-Mmc により蛍光ラベル化させ HPLC により分離を行った. キャリアー溶媒として水と MeOH との混合溶媒系について検討したがいかなる混合比でも Ura と 5-FU の分離が不十分であった. 一方, CH₃CN をキャリアー溶媒に添加するとこれらのピークの分離度が改善されることが分かり, 溶媒系として MeOH : CH₃CN : 水 = 45 : 10 : 45 (v/v) を用いることにした. この条件で 3 種類のラベル化されたヌクレオベースを分離したクロマトグラムを Fig. 3 に示した. 試料注入後 5 分程度に前述のラベル化剤に由来する分解物ピークが出る. このピークは *p*-NBA による無蛍光化処理を迅速に行えば小さくすることが可能であるが, これらのヌクレオベースの定量には影響を及ぼさなかった.

本法がこれらピリミジン塩基以外のイミド構造を有する化合物にも適用可能なことを示すため Bar と m. Bar を選び同様なラベル化操作を行い, HPLC に適用したクロマトグラムを Fig. 4 に示した. 溶媒系には 80 v/v% MeOH を用いており, CH₃CN を添加しなくても充分分離可能であった. Fig. 4 の 1 のピークはバルビタール類の一種である m. Bar の Mmc 誘導体であり Bar に対する内部標準物質として用いている.¹⁰⁾

Fig. 3. Separation of Mmc-Pyrimidine Nucleobases on a C₁₈ Column

Mobile phase; MeOH: CH₃CN: water = 45: 10: 45 (v/v), flow rate; 0.8 ml/min. 1; Mmc-Ura, 2; Mmc-5-FU, 3; Mmc-Thy.

Fig. 4. Separation of Mmc-Barbital and Mmc-Mephobarbital on a C₁₈ Column

Mobile phase; MeOH: water = 80: 20, flow rate; 0.6 ml/min. 1; Mmc-mephobarbital, 2; Mmc-barbital.

今回開発した蛍光ラベル化による定量法の検出限界は S/N 比を 2 とした場合、絶対量で Ura : 5 pg, Thy : 15 pg, 5-FU : 10 pg 及び Bar : 5 pg を得、しかも定量的直線性も前報と同様⁴⁾に良好なものが得られた。

現在イミド構造を有する薬物は多数存在するにもかかわらず、操作面や感度、経済性で満足できる定量法は少ない。このため本法による蛍光ラベル化定量法はラベル化反応時間の短縮、ラベル化剤処理の簡略化、さらに HPLC の分離は単一溶媒系で可能なことなどの特徴を有し有効であると考えられる。一方、生体試料におけるこれらの化合物の定量を考えると、その前処理法として陰イオン交換樹脂の利用が効果的であることが知られている。¹⁷⁾したがってその前処理法と本報によるラベル化法を組み合わせることにより、イミド系薬物の臨床用ルーチン分析法の確立が充分可能になると考えられる。また、本反応機構の検討に用いた donor-acceptor の概念に関し、今回は 6 種の溶媒を対象にしたが今後他の溶媒や金属イオンとの関係などについて考察したい。

引用文献及び注

- 1) T. Marunaka, Y. Umeno, *J. Chromatogr.*, **157**, 321 (1978).
- 2) 川口安郎, 中村芳正, 伊藤俊幸, 武田節夫, 丸中照義, 藤井節郎, 薬誌, **98**, 525 (1978).
- 3) T. Marunaka, Y. Umeno, K. Yoshida, M. Nagamachi, Y. Minami, S. Fujii, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 1296 (1980).
- 4) 岩本真樹, 吉田 滋, 長 敏夫, 広瀬信吾, 薬誌, **103**, 967 (1983).
- 5) A. Hulshoff, A. D. Förch, *J. Chromatogr.*, **220**, 275 (1981).
- 6) W. Düniges, *Anal. Chem.*, **49**, 442 (1977).
- 7) S. Lam, E. Grushka, *J. Chromatogr.*, **158**, 207 (1978).
- 8) J. A. Secrist, J. R. Barrio, N. J. Leonard, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1262 (1971).
- 9) V. Gutmann 著, 大瀧仁志, 岡田 勲訳, “ドナーとアクセプター,” 学会出版センター, 東京, 1983, p. 22, 32, 150.
- 10) 小田良平, 庄野利之, 田状岩夫編 “化学増刊 クラウンエーテルの化学,” 化学同人, 京都, 1978, p. 8, 115.
- 11) H. D. Durst, M. Milano, E. J. Kikta, Jr., S. A. Connelly, E. Grushka, *Anal. Chem.*, **47**, 1797 (1975).
- 12) O. Gyllenhaal, H. Brötell, P. Hartvig, *J. Chromatogr.*, **129**, 295 (1976).
- 13) W. Düniges, A. Meyer, K. Müller, M. Müller, R. Pietschmann, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **288**, 361 (1977).
- 14) 岩本真樹, 吉田 滋, 広瀬信吾, 第 6 回生体成分の分析化学シンポジウムで発表, 札幌, 1983 年 9 月.
- 15) M. Iwamoto, S. Yoshida, S. Hirose, *Bunseki Kagaku*, **33**, E167 (1984).
- 16) W. Düniges, K. Müller, M. Müller, *Methodol. Suro Biochem.*, **7**, 257 (1978).
- 17) 岩本真樹, 吉田 滋, 市川克己, 木原理雄, 芳田淳一, 広瀬信吾, 日本薬学会第 104 年々会で発表, 仙台, 1984 年 3 月.