螢光法によるニトロフラン誘導体の定量

藤岡 弘, 中西 豊, 中村 清

大日本製薬株式会社総合研究所¹⁾

Fluorometric Analysis of Nitrofuranyl Derivatives

HIROSHI FUJIOKA, YUTAKA NAKANISHI, and KIYOSHI NAKAMURA

Research and Development Division, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.¹⁾

(Received October 21, 1971)

A fluorometric method for the determination of 2-(5-nitro-2-furyl)vinyl derivatives was developed. When exposed to ultraviolet ray of 405 m μ in a 1:1 mixture of pyridine and buffer (less than pH 7) or pyridine and water, these substances give the characteristic yellow fluorescence (525 m μ). By measurement of the fluorescence intensity, 2-methyl-4-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-6-pyrimidinol (I) could be determined quantitatively in a concentration range of 0.01—1.0 μ g/ml. This method is also applicable for the detection of a smaller amount of around 0.001 μ g of I as a yellow spot on thin-layer chromatogram sprayed with a 1:1 mixture of pyridine and phosphate buffer of pH 5.5.

The fluorescence in a 1:1 mixture of pyridine and water is specific for compounds having a 5-nitro group along with a vinyl group adjacent to the furan ring. The fluorescence intensities of these compounds are affected by the chemical structures of substituent groups bonded to the vinyl group.

By applying this fluorescence phenomenon, a routine method for the quantitative determination of I in plasma was developed. This method is as follows: I is extracted from plasma with chloroform, dissolved in a 1:1 mixture of pyridine and phosphate buffer (pH 5.5), and determined by measurement of the fluorescence intensity. This method is sensitive, reproducible, and is not interfered by the presence of plasma components.

ニトロフラン誘導体の生体内挙動を明らかにするためには1 μ g以下の量を測定出来る方法が必要である。現在まで1 μ g以下の量を測定出来る方法は報告されておらず、ニトロフラン誘導体の定量は一般に紫外吸収スペクトルの測定あるいはガスクロマトグラフィーによって行なわれている。著者らは、2-(5-nitro-2-furyl)vinyl誘導体がピリジンと水の混合溶媒中で特有の螢光を発することを見いだした。本報では代表物質として、2-methyl-4-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-6-pyrimidinol (I)を中心に螢光強度におよぼす種々の要因を検討し、また化学構造と螢光特性の関係について検討した。さらに本螢光現象を応用してIの血漿濃度測定法を確立したのでこれらの結果を報告する。

実 験 の 部

測定装置 日立自記分光光度計 EPS-2U 型付属 G-2 型螢光分光装置, 日立 MPF-2A 型分光螢光光度計, CHROMATO-VUE® (ULTRA-VIOLET PRODUCTS, INC.)

試薬 ピリジン (試薬特級), 緩衝液 pH 1—5 (塩酸-酢酸ナトリウム),²⁾ pH 5—9 (1/30M 第1リン酸ナトリウム-1/30M 第2リン酸ナトリウム), pH 9—10 (炭酸ナトリウム-ホウ酸-塩化カリウム).³⁾

薄層クロマトグラフィー Merck Silica gel G 0.25 mm (120°, 2時間送風乾燥).

2-Methyl-4-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-6-pyrimidinol (I)の血漿濃度測定法 35 mlの共栓遠沈管に血漿 1 ml をとりさらに pH 5.5 の磷酸緩衝液 4 ml およびクロロホルム 10 ml を加えて 15 分間振とうする。遠心分離後

1) Location: Enoki-cho, Suita, Osaka.

2) G.S. Walpole, *J. Chem. Soc.*, CV, 2501, 2521 (1914).

3) W.R.G. Atkins, C.R. A. Pantin, *Biochem. J.*, 20, 102 (1926).

クロロホルム層 5 ml を 10 ml の共栓試験管にとり、クロロホルムを留去する。残渣をピリジンと pH 5.5 磷酸緩衝液の等量混液中に溶解して 405 μm の励起光により 525 μm の蛍光強度を測定する。

蛍光光度計の補正 補正のための標準物質として硫酸キニーネの 0.1 規定硫酸溶液を用いた。Table III に示した蛍光強度測定条件では本品の 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の溶液は励起光 350 $\text{m}\mu$ で 450 $\text{m}\mu$ の蛍光強度が 13.0 である。

図および表に、使用した蛍光装置の記載がないものは EPS-2U 型付属蛍光装置を使用した。

結 果

2-Methyl-4-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-6-pyrimidinol (I) の蛍光

蛍光強度におよぼす緩衝液の pH の影響 ピリジンと種々の pH の緩衝液との等量混合溶媒中での (I) の蛍光強度を測定した結果を Fig. 1 に示す。緩衝液の pH が 7 以下では I の蛍光強度は pH に依存せず一定であった。また同時に緩衝液の組成も蛍光強度に影響しなかった。緩衝液の pH が 9 以上では I は励起光により分解して蛍光を発しない。

Fig. 1. Effect of pH of Buffer on the Fluorescence Intensity of I in a 1:1 Mixture of Pyridine and Buffer

concentration of I: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
excitation: 405 $\text{m}\mu$
fluorescence: 525 $\text{m}\mu$

Fig. 2. Effect of Pyridine Content in a Mixture of Pyridine and pH 5.5 Buffer on the Fluorescence Intensity of I

concentration of I: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
excitation: 405 $\text{m}\mu$
fluorescence: 525 $\text{m}\mu$

蛍光強度におよぼすピリジンと緩衝液の混合割合の影響 pH 5.5 の磷酸塩緩衝液とピリジンの混合比と I の蛍光強度との関係を Fig. 2 に示す。Fig. 2 から明らかなように I の蛍光強度はピリジンが 50% (V/V) のとき最高値を示し、ピリジンの割合がそれより増加してもあるいは減少しても低下した。ピリジンあるいは緩衝液の単一溶媒中では蛍光は観察されない。

蛍光強度と濃度の関係 Fig. 3 はピリジンと pH 5.5 磷酸塩緩衝液の等量混液中における I の蛍光強度と濃度の関係を示す図である。0.01—0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲で蛍光強度が濃度に比例することを示しているが、さらに蛍光光度計の感度を切り変えることによって直線性の範囲は一層広がり、かなり広い濃度範囲で定量が可能である。さらに I は薄層クロマトグラフィーによって 0.001 μg の微量でも検出することが出来る。すなわち I をたとえばクロロホルムとメタノールの (9:1) 混合溶媒で展開する。溶媒の揮散後 50% ピリジン水を噴霧すると紫外線 [CHROMATO-VUE: 長波長ランプ (標示波長 320—380 $\text{m}\mu$) 下で R_f 0.40 の位置に鮮明な黄色スポットが観察される。これらの実験結果から本法は非常に感度のよい検出法であることがわかる。

蛍光強度の経時変化 ピリジンと pH 5.5 リン酸緩衝液との混合溶媒中での I の濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の高濃度になるとその蛍光強度は紫外線照射 (励起光) によって経時的に強くなり、以後一定値に達する。その強度が一定値に達した蛍光は非常に安定であってそれ以上変化することはない。Fig. 4 に紫外線照射時間と (I) の蛍光強度の関係を示す。一方 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の低濃度では I の蛍光強度は数分以内に一定値に達する。励起光の強度に関して定量的な検討を行っていないが、光源が強ければ蛍光強度はさらに短時間で一定になることが予

Fig. 3. Relationship between the Fluorescence Intensity and Concentration of I in a 1:1 Mixture of Pyridine and pH 5.5 Buffer

excitation: 405 mμ
fluorescence: 525 mμ
Hitachi Spectrofluorometer MPF-2A was used in this experiment.

Fig. 4. Change in Fluorescence Intensity of I in a 1:1 Mixture of Pyridine and pH 5.5 Buffer with Excitation Time

concentration of I: 10 μg/ml
excitation: 405 mμ
fluorescence: 525 mμ

想される。

ピリジン以外のピリジン誘導体と水との混合溶媒系での蛍光 I の蛍光はピリジンと水の混合溶媒系以外に Table Ia) に示したピリジン誘導体と水との混合溶媒系においても観察されいずれの場合も強い黄色蛍光である。しかしながらこの場合 Table Ib) に示したようにピリジン誘導体が N-oxide 体になるとこれと水との混合溶媒中ではもはや I の蛍光は観察されなくなる。

TABLE I. Pyridine and Pyridine N-oxide Derivatives

a) ^{a)} Pyridine derivatives					
b) ^{a)} Pyridine N-oxide derivatives					

a) When exposed to ultra-violet light of wave length 405 mμ, I fluoresce in a mixture of water and pyridine derivatives described in Table Ia), but do not fluoresce in a mixture of water and pyridine N-oxide derivatives described in Table Ib).

ニトロフラン誘導体の化学構造と蛍光

2-(5-Nitro-2-furyl)vinyl 誘導体と 2-(2-Furyl)Vinyl 誘導体の比較 Table IIa) に 2-(5-nitro-2-furyl)vinyl 誘導体とそれらに対応するニトロ基のない化合物の発蛍光性を比較した。フラン環の 5 位にニトロ基の結合した化合物 (I—VII) はすべてピリジンと pH 5.5 磷酸緩衝液の等量混液中で 400 mμ の励起光により 520 mμ 付近に強い蛍光を発する。Table II ではこれらの化合物の蛍光強度を I の蛍光強度を 100 として相対値で示した。データから明らかなように蛍光強度はビニール基に結合する異項環の化学構造によってかなり影響を受けることがわかる。また異項環として同じピリジン環を有する化合物 (III, VII) でも置換位置によって蛍光強度は異

TABLE II. Relationship between Fluorescence and Chemical Structures of Nitrofuranyl Derivatives

	Compounds which fluoresce yellow color	Excitation ^{a)} max. mμ	Emission ^{a)} max. mμ	RFI ^{a)}		Compounds which do not fluoresce
a) ^{b)}	I	405	525	100	VIII
	II	400	520	35	K
	III	400	525	71	K
	IV	400	520	34	XI
	V	400	525	30	XII
	VI	405	500	15	XIII
b) ^{b)}	VII	400	525	37	XIV
c) ^{b)}					XV
					XVI
					XVII
					XVIII

a) Measurements were made in a 1:1 mixture of pyridine and pH 5.5 buffer solution. The fluorescence intensity of I was arbitrarily set at 100. The total error in each measurement was within 3%. Here RFI stands for relative fluorescence intensity.

b) Compounds were classified into 3 categories: a) to clarify the effect of nitro group at 5-position of furan ring, b) to clarify the effect of vinyl and ethyl group between furan and heterocyclic ring, and c) to clarify the effect of direct bonding of furan ring to heterocyclic ring on fluorescence characteristics, respectively. Hitachi Spectrofluorometer MPR-2A was used in this experiment.

り、パラ体 (III) はオルト体 (VII) の約 2 倍の蛍光強度を示す。一方対応するニトロ基のない化合物 (VIII—XIII) は全く蛍光を発しない。このことからニトロフラン誘導体の発蛍光性にとってニトロ基は必須の原子団であることがわかる。

2-(5-Nitro-2-furyl)vinyl 誘導体と 2-(5-Nitro-2-furyl)ethyl 誘導体の比較 Table IIb) から明らかのようにフラン環の 2 位にビニール基の結合した化合物 (VII) は特有の黄色蛍光を発するけれども、それに対応するビニール基がエチル基で置換した化合物 (XIV) は全く蛍光を発しない。さらに Table IIc) に示すごとくフラン環の 2 位に異項環が直結した化合物 (XV—XVIII) は全く蛍光を発しない。これらの事実からニトロフラン誘導体

TABLE III. Relationship between the Plasma Concentration of (I) and the Fluorescence Intensity Obtained through the Analytical Procedure^{a)}

Plasma concentration of (I) $\mu\text{g/ml}$	Fluorescence intensity	Avarage	Standerd error
0 (Plasma blank)	0.0	0.25	0.14
	0.0		
	0.5		
	0.5		
0.25	12.0	12.3	0.14
	12.0		
	12.5		
	12.5		
0.50	24.0	24.9	0.32
	25.0		
	25.0		
	25.5		
1.00	45.0	48.1	1.42
	46.5		
	50.0		
	51.0		
2.00	93.5	95.6	0.94
	95.0		
	96.0		
	98.0		

Fluorometric condition was as follows; with Hitachi Spectrofluorometer MPF-2A, excitation 405 $m\mu$ (slit 5), emission 525 $m\mu$ (slit 5), sensitivity 5.

a) Four milliliter of pH 5.5 phosphate buffer and 10 ml of chloroform are added to 1 ml of plasma containing (I) or not in a 40 ml glass-stoppered centrifuge tube. The tube was shaken for 15 minutes with a mechanical shaker and then centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm. Five milliliters of chloroform phase are transferred in 10 ml centrifuge tube and chloroform was evaporated under a stream of hot air. The residue was dissolved in 5 ml of a 1:1 mixture of pyridine and pH 5.5 phosphate buffer. The fluorescence intensity of this solution is measured.

の発蛍光性にとってフラン環の2位に結合したビニール基は必須の原子団であることがわかる。

以上の実験結果はニトロフラン誘導体のピリジンと水の混合溶媒系での蛍光が 2-(5-nitro-2-furyl)vinyl 構造を有する化合物に特有であることを示している。

(I) の血漿濃度測定法

データーの再現性と血漿成分に起因するブランク値について

Table III は既知量の I をあらかじめ血漿に加えて実験の部に記載した I の血漿濃度測定法に従って定量して得られたデーターである。

各濃度について4回の実験を行ない各々の値およびそれらの平均値と標準誤差を示した。これらの結果から明らかなようにデーターの再現性はきわめてよい。また I を含まない血漿を同様に処理したとき蛍光をほとんど発しない。これは本定量法において血漿に由来する蛍光防害物質がほとんど存在しないことを示している。Fig. 5 はこれを図示したもので蛍光強度は血漿濃度に完全に比例し、かつ血漿からの回収率はほぼ 100% であった。それ故本定量法を用いて 1 ml の血漿を分析することによって血漿中に 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度で存在する I を精度よく定量することが出来る。

謝辞 本研究を行なうにあたり終始御鞭撻賜わった当社取締役総合研究所副所長 高松秀二博士、試料の合成に御協力頂いた部長 南 新作博士および藤田昭夫博士に感謝します。

Fig. 5. Quantitative Plot Showing Linear Relationship between the Fluorescence Intensity and the plasma Concentration of I

Experimental conditions are identical to those described in Table III.