

高速液体クロマトグラフィーによる化学発光検出のための ピリミジン化合物のプレラベル化

吉田 滋[®], 浦上康司, 木藤正弘, 竹島繁男, 広瀬信吾*

(1989 年 11 月 18 日受理)

高感度な化学発光 HPLC でピリミジン化合物を定量するために蛍光標識体となるべきクマリン誘導体を検索したところ 7-diethylamino-3-[4-((iodoacetyl)amino)phenyl]-4-methylcoumarine (DCIA) が適していた。このため DCIA によるピリミジン化合物のプレラベル化を行い、クロマトグラフィー特性を調べると共に測定感度を上昇させることを試みた。DCIA は無水炭酸カリウムと 18-crown-6 の共存下アセトン中で目的物と反応させた。DCIA 誘導体の分離は逆相クロマトグラフィーで行い検出には化学発光を用いた。化学発光は DCIA-Bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate-過酸化水素系により発生させた。反応条件、クロマトグラフィー条件及び測定系などの最適化を行った結果、誘導体化された試料の検出限界は注入量で 5-fluorouracil は 19 fmol, uracil は 22.5 fmol 及び 5-fluorouridine は 10 fmol であった。又、これらの薬物が血清 1 ml 当たり 1.25~250 ng 含まれる濃度範囲で検量線の直線関係が得られた。

1 緒 言

ピリミジン及びその関連化合物の定量は核酸成分の研究において重要であり、微量で低濃度な試料を選択的に、かつ高感度に定量する手段が求められている。これらの目的のためにラジオイムノアッセイ¹⁾, GC-MS²⁾ や UV 検出法³⁾などによる定量法が報告されているが、放射化分析であったり、高価な機器を必要としたり、測定感度が上昇しないなどの欠点を有している。そこでピリミジン化合物を実用的で高感度に分析するための手段として HPLC の検出系に化学発光を利用することを試みた。化学発光 HPLC の手段としては化学発光物質を標識体とする分析法⁴⁾と発蛍光性物質を蛍光標識体とする方法⁵⁾の2種が主として考えられる。後者の方法は各種の発蛍光性物質の中からピリミジン化合物と反応しやすい化合物を選べるため今回の目的に相当であると考えた。更に、発蛍光性物質としてはカルボン酸のラベル化剤として開発された、4-bromomethyl-7-methoxycoumarine (Br-Mmc)⁶⁾, 4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarine (Br-Mdmc)⁷⁾ 及び 7-diethylamino-3-[4-((iodoacetyl)amino)phenyl]-4-methylcoumarine (DCIA)⁸⁾ の3種を選んだ。これらのうち Br-Mmc と Br-Mdmc はピリミジン化合物と反応することが既に知られており⁹⁾¹⁰⁾ 蛍光標

識体となり得るかを検討した。更に DCIA についても同様の検討を加えた。

化学発光の測定には高感度分析が期待できるフォトンカウンティング法 (PC 法) を応用することを試みた。PC 法では光量子の検出を 1 秒当たりのカウント数 (cps) として測定するため、ややばらつきが大きくなる欠点がある。このためデータを一度パーソナルコンピュータに入力した後スムージング処理を行うことの効果についても考察を行った。

以上のような目的のための試料として抗しゅよう剤としてよく用いられている 5-fluorouracil (5-FU), 5-fluorodeoxy-uridine (FdUrd) 及び uracil (Ura) を選び化学発光検出 HPLC への応用を試みた。

2 実 験

2.1 試 薬

5-FU, FdUrd, Ura, 18-crown-6, Bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate (TCPO) などは半井テスクから購入した。DCIA は Molecular Probes 社より、又 Br-Mmc や Br-Mdmc は Sigma 社より購入した。その他の試薬や溶媒はすべて特級を用いた。コントロール血清はデン化生研の臨床分析用のものを用い、ヒト血清は健常人ボランティアから得たものを使用した。

* 京都薬科大学: 607 京都府京都市山科区御陵中内町 5

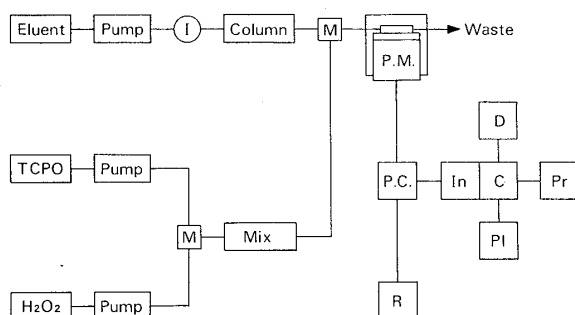


Fig. 1 Schematic diagram of the HPLC apparatus with chemiluminescence detection

I: injector; Mix: postcolumn mixer; P.M.: photomultiplier tube; P.C.: photon counter; R: recorder; In: interface; C: computer; D: display; PI: plotter; Pr: printer

2.2 装置

分析システムの概要を Fig. 1 に示した。移動相のポンプとして島津 LC-4A, 又化学発光試薬用のポンプとして日本分光 BIP-I, 光電子増倍管は浜松ホトニクス R-585, フォトンカウンターは浜松ホトニクス C-767, パーソナルコンピューターは NEC PC-9801E, ディスプレイは NEC PC-8853n, プリンターは島津 UP-2000, プロッターは EPSON HI80 をそれぞれ用いた。

2.3 クロマトグラフィー

分離カラムには Nucleosil 5C₁₈ (Nagel 製) を長さ 20 cm 内径 0.4 cm のステンレスカラムにケムコ製のエコノパッカー CPP-085 を用いスラリー法によって充てんした。移動相にはアセトニトリルとリン酸緩衝液 (4 mM, pH 7.5) の 1:1 混液を用いた。流量は 0.6 ml/min にした。

2.4 化学発光用反応溶液

TCPO は 4.4 mM 酢酸エチル溶液とし, H₂O₂ は 1 M アセトン溶液とした。それぞれの溶媒の流量を 0.7 ml/min としミキシングカラム (内径 0.4 cm, 長さ 20 cm のカラムに 200~400 メッシュの CPG ガラスを充てん) で混合した後, 分離カラムからの溶出液と再度混合した。

2.5 ラベル化反応

ピリミジン化合物のアセトン溶液を 100 μ l 入れた 1 ml のネジ口試験管に DCIA 溶液 (150 μ g/ml アセトン) を 50 μ l, 18-crown-6 溶液 (15 μ g/ml アセトン) を 50

μ l, そして無水炭酸カリウムを 500 μ g 加えた。その混合溶液を 30 分間超音波かき混ぜてラベル化反応を行った。

2.6 血清試料の前処理

標準試料はヒト血清に既知濃度の分析目的物を加えたものを用いた。前処理として, 血清 0.5 ml をメンブランフィルター (ミリポア UFC3TGC00) に入れ遠心分離機 (1000 g, 20 分) で濾過した後, その濾液 0.1 ml に酢酸エチル 4 ml を加えて 15 分間振り混ぜ抽出を行った。けん濁液を遠心分離 (1000 g, 5 分) 後, 有機相の 3.5 ml を分取し窒素気流中で蒸発乾固し, アセトン 0.1 ml を加えて残留物を再溶解した溶液をラベル化反応に供した。

3 結果及び考察

3.1 化学発光用蛍光標識化剤の検討

化学発光を生じさせやすい蛍光標識化剤の条件として酸化電位の低いこと, 蛍光波長が長波長領域に存在すること, 又高い蛍光収率を有することなどが必要とされている¹¹⁾。このため Br-Mmc, Br-Mdmc 及び DCIA の励起, 蛍光波長と蛍光収率を常法に従い求め Table 1 に示した。又 DCIA は他の 2 種と異なり電子供与基であるアミノ基を有しているため酸化電位が低くなり, 励起一重項状態へ移行させるエネルギーも小さくてすむと考えられた。これらの結果は DCIA が Br-Mmc や Br-Mdmc より化学発光の蛍光標識化剤として有利なことを示唆している。このため三者の化学発光を測定したところ DCIA にのみ発光が認められた。又これらの蛍光ラベル化剤でピリミジン化合物を誘導体化したものが化学発光を生じたりあるいは消失する可能性が考えられた。このため各誘導体の化学発光を測定したところ DCIA 誘導体のみ発光が認められた。そこで DCIA によるピリミジン化合物のラベル化のための最適条件を検討した。

Table 1 Absorbance, fluorescence wavelengths and quantum yield for coumarin derivatives

Derivatizing agent ^{a)}	$\lambda_{\max}/\text{nm}$		$Q^b)$
	Absorption	Emission	
Br-Mmc	325	390	0.02
Br-Mdmc	340	420	0.24
DCIA	403	475	0.51

a) in 80% methanol; b) quantum yield

上の最適な結果に基づいて 5-FU, FdUrd 及び Ura の各 50 ng を 0.2 ml のアセトン中でラベル化し化学発光 HPLC で検出したクロマトグラムを Fig. 3 に示した。

3・4 スムージング効果

PC 法は非常に高感度な検出法であるが cps 又は cpm

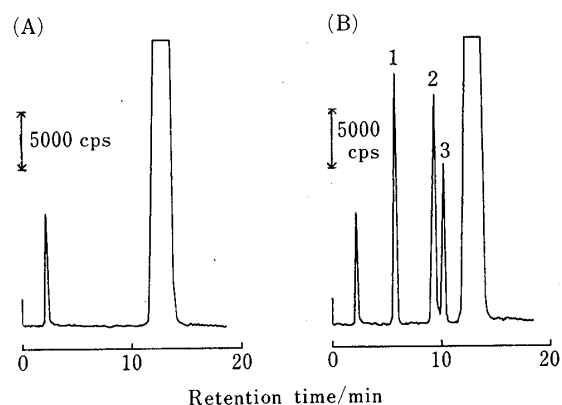


Fig. 3 Chromatogram of chemiluminescent derivatives of a standard mixture of pyrimidine compounds

(A) blank; (B) sample (1: 5-FU, 2: Ura, 3: FdUrd). 5-FU, Ura, FdUrd: each 50 ng; DCIA: 10 μ g; 18-crown-6: 1 μ g; K_2CO_3 : 500 μ g in 0.2 ml acetone; Mobile phase: CH_3CN -4 mM phosphate buffer = 1:1; Flow rate: 0.6 ml/min

で測定するために測定値のばらつきが大きく、従って S/N 比が悪くなるのが最大の欠点となっている。この対応策としてスムージングを行い検出限界を向上させることを試みた。スムージングの方法としては多項式適合法¹²⁾を用いた。この方法は測定波形が各サンプル点の近傍で多項式曲線で表現できると仮定して、この近傍内で最小二乗法規範に基づき測定波形と多項式曲線を適合させる方法である。今回は 1 秒ごとに得られる PC のデータをすべてインターフェイスを介して一度ディスクに収めた。測定終了後収められたデータを読み出し、二次・三次多項式適合法による演算処理をした後、ディスプレイに表示した。なお、適合法に必要な平滑化演算には Savitzky-Golay 法¹³⁾によるコンボリューションを用いた。Fig. 4(A) にはヒト血清中の 5-FU, FdUrd 及び Ura を測定するためのクロマトグラムをスムージングしない状態で示した。それぞれの濃度は注入量で 5-FU 10 pg (80 fmol), Ura 50 pg (450 fmol) 及び FdUrd 10 pg (40 fmol) である。この状態では S/N が悪すぎて定量に用いられない。Fig. 4(B) は (A) の感度を 5 倍に拡大し測定したものであり S/N 比の悪さは同様である。そこでこのクロマトグラムを 15 点平滑化を行ったところ (C) のようになり、検量線の一部として十分使用できる状態となった。平滑化を行う点の数の検討を行ったところ 15 点以下ではスムージングの効果が小さく、逆に 15 点以上では平滑化されすぎてピーク高きの減少と

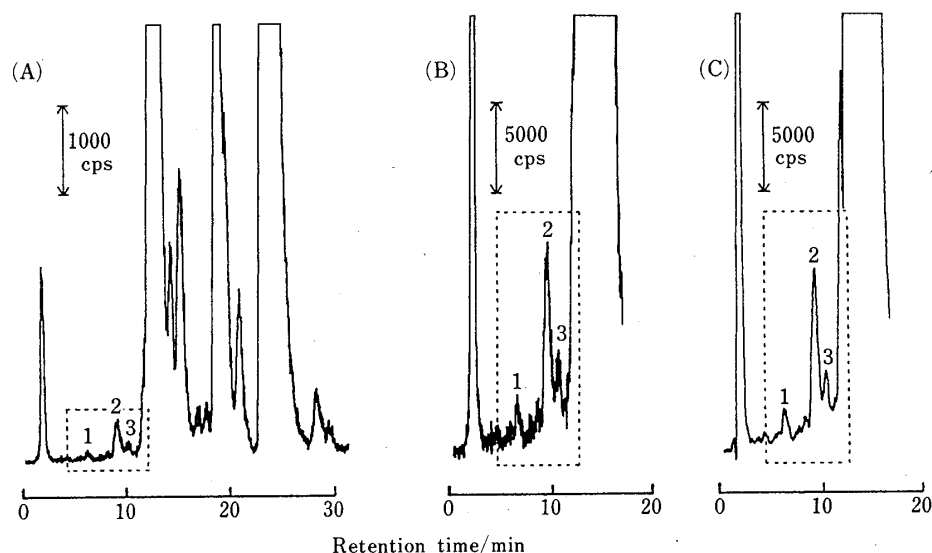


Fig. 4 Smoothing effect by simplified least squares procedures

(A) (B) no treatment; (C) convoluted chromatogram (convolution number: 15). 1: 5-FU; 2: Ura; 3: FdUrd. 5-FU, FdUrd: 500 pg; Ura: 2.5 ng; DCIA: 25 μ g; 18-crown-6: 2.5 μ g; K_2CO_3 : 500 μ g in 0.2 ml acetone

Table 2 Reproducibility of pyrimidine compounds in serum by chemiluminescence HPLC

No.	Recovery, %		
	5-FU	Ura	FdUrd
1	75.7	83.2	82.0
2	75.4	82.1	80.9
3	75.9	85.6	81.2
4	79.8	83.5	77.6
5	76.7	82.1	81.3
m. v.	76.7	83.3	80.6
s. d.	1.80	1.43	1.72
R. S. D., %	2.34	1.72	2.14

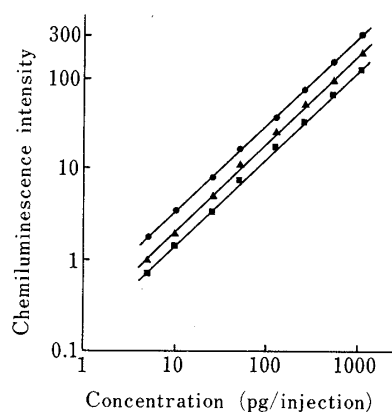


Fig. 5 Relationship between chemiluminescence intensity and amount of each pyrimidine compound

DCIA: 10 μ g; 18-crown-6: 1 μ g; K_2CO_3 : 500 μ g in 0.2 ml acetone. (●) Ura: $Y = 0.301X - 0.030$ ($r = 0.9993$); (▲) FdUrd: $Y = 0.298X - 0.031$ ($r = 0.9991$); (■) 5-FU: $Y = 0.299X - 0.029$ ($r = 0.9994$)

なって現れた。以上の結果より、PC 法にスムージング法を適用することは大変効果的であり無処理の場合と比べ検出限界を約 10 倍上昇させることが可能となった。

3・5 回収試験と検量線

健康人血清 1 ml に 5-FU, FdUrd, Ura の各 250 ng を添加して分析した結果と標準物質を用いた分析の結果を比較し、回収率として Table 2 に示した。又再現性についても同時に Table 2 に示した。両者とも良好な結果が得られ、特に回収率については従来法より高い値となった¹⁴⁾。更にこれらの薬物を血清 1 ml 当たり 1.25 ng~250 ng の濃度範囲で添加し、ラベル化処理後の

溶液 4 μ l ずつを注入 (注入量にして 5-FU: 38 fmol~7.8 pmol, Ura: 45 fmol~9.0 pmol, FdUrd: 20 fmol~4.0 pmol に相当する) して得られた検量線を Fig. 5 に示した。今回開発した化学発光 HPLC-PC 検出法-多項式適合スムージング法による定量法の検出限界は S/N 比を 2 とした場合、注入量で 5-FU: 19 fmol, Ura: 22.5 fmol, FdUrd: 10 fmol であった。これらの値は従来の蛍光ラベル化法⁹⁾¹⁰⁾¹⁴⁾に比べ約 20~40 倍の感度上昇に相当し、その高感度性が注目される結果となった。

文 献

- 1) T. W. Bruice, C. Garrett, Y. Wataya, D. V. Santi: "Methods in Enzymology", Vol. 64, p. 125 (1980), (Academic Press, Inc., London).
- 2) P. L. Stetsom, J. Maybaum, U. A. Shukla, W. D. Ensminger: *J. Chromatogr.*, **375**, 1 (1986).
- 3) F. P. LaCreta, W. M. Williams: *J. Chromatogr.*, **414**, 197 (1987).
- 4) E. H. J. M. Jansen, R. H. Van Den Berg, R. Both-Miedema, C. Eukelaar-Willemsen, G. Zomer: *Anal. Chim. Acta*, **205**, 175 (1988).
- 5) M. Tod, R. Farinotti, G. Mahuzier: *Anal. Chim. Acta*, **217**, 11 (1989).
- 6) W. Düniges: *Anal. Chem.*, **49**, 442 (1977).
- 7) R. Farinotti, J. Bourson, S. Kirkiacharian, B. Valenr, G. Mahuzier: *J. Chromatogr.*, **269**, 81 (1983).
- 8) T. O. Sippel: *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 314 (1981).
- 9) S. Yoshida, S. Hirose, M. Iwamoto: *J. Chromatogr.*, **383**, 61 (1986).
- 10) S. Yoshida, T. Adachi, S. Hirose: *Microchem. J.*, **39**, 351 (1989).
- 11) C. L. R. Catherall, T. F. Palmer, R. B. Cundall: *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **80**, 837 (1984).
- 12) A. Savitzky, M. J. E. Golay: *Anal. Chem.*, **36**, 1627 (1964).
- 13) H. H. Madden: *Anal. Chem.*, **50**, 1383 (1978).
- 14) M. Yamaguchi, M. Nakamura, N. Kuroda, Y. Ohkura: *Anal. Sci.*, **3**, 75 (1987).



Precolumn derivatization of pyrimidine compounds for chemiluminescence detection in HPLC.

Shigeru YOSHIDA, Koji URAKAMI, Masahiro KITO, Shigeo TAKESHIMA and Shingo HIROSE (Kyoto Pharmaceutical University, 5, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto-shi, Kyoto 607)

Precolumn derivatization with 7-(diethylamino)-3-[4-((iodoacetyl)amino)phenyl]-4-methylcoumarin (DCIA) is utilized to improve the chromatographic and detection properties of pyrimidine compounds. The reagent reacts with pyrimidine compounds in acetone in the presence of crystalline anhydrous potassium carbonate and 18-crown-

6. The DCIA derivatives are separated using reversed-phase LC and detected using chemiluminescence generated by the reaction of DCIA-Bis(2,4,6-trichlorophenyl)-oxalate-hydrogen peroxide. After optimization of the reaction, chromatographic and detection conditions, the limits of the detection were 19 fmol for 5-fluorouracil, 22.5 fmol for uracil, and 10 fmol for 5-fluorodeoxyuridine per injection, with a linearity of two orders of magnitude. This chemiluminescence HPLC technique is useful for the simultaneous determination of 5-fluoropyrimidines, used

as a chemotherapeutic, in small volumes of serum.

(Received November 18, 1989)

Keyword phrases

chemiluminescence HPLC; precolumn derivatization; pyrimidine compounds; uracil; 5-fluorouracil; 5-fluorodeoxyuridine.