

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) およびガスクロマトグラフィー (ECD-GLC) による 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU)

および代謝物の体液中濃度測定法

森 研二・小部 秀行・滑川 宏
御園 等・横山 昌鶴・小針 孝司

三井製薬工業株式会社生物科学研究所

(昭和 55 年 7 月 24 日受付)

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) およびガスクロマトグラフィー (ECD-GLC) を用い、1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) および代謝物のヒト体液中濃度測定法の検討を行なった。

HCFU 投与後の試料中の HCFU はクロロホルム抽出後 HPLC にて、5-FU はクロロホルム抽出後の水層からアンバーライト XAD-2 樹脂にて分離しクロロメチルジメチルシリル化した後 ECD-GLC にてそれぞれ定量する方法を開発した。さらに、HCFU および 5-FU 骨格を有する全代謝物をアルカリ性条件下で 5-FU に分解して測定 (総 5-FU) することにより、1-(5-carboxypentylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPEFU), 1-(3-carboxypropylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPRFU), 1-(5-hydroxyhexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (HHCFU) および 1-(5-oxohexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (OHCFU) 等の FU 骨格を有する全中間酸化代謝物の総濃度も定量できた。

この方法による HCFU, 5-FU および総 5-FU の検出限界はそれぞれ 20, 10 および 20 ng/ml であった。

本法は、操作が簡便であり、しかも他の薬剤を併用投与した試料にも適用でき、臨床試料のルーチン分析に適している。

また、本法とバイオアッセイ法とによる同一試料の測定結果は互いに良く相関した。

緒 言

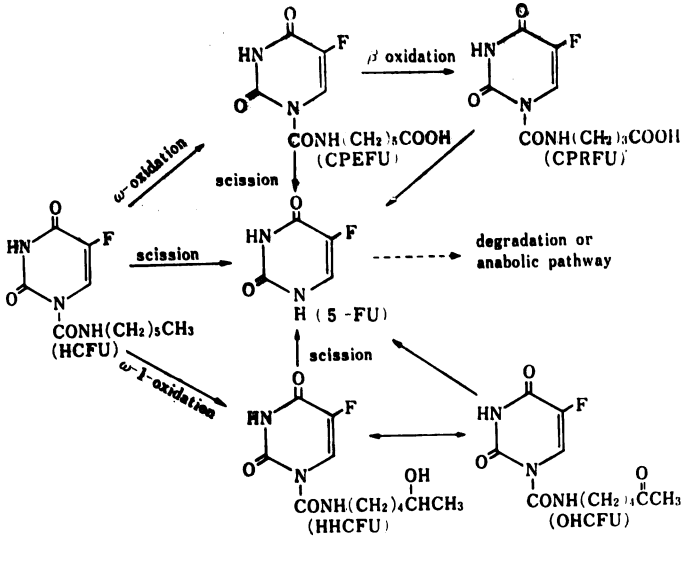
新抗腫瘍性化合物 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (以下、HCFU と略す) は生体内で代謝され、直接、あるいは中間酸化代謝物 1-(5-carboxypentylcarbamoyl)-5-fluorouracil (以下 CPEFU と略す), 1-(3-carboxypropylcarbamoyl)-5-fluorouracil (以下 CPRFU と略す), 1-(5-hydroxyhexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (以下 HHCFU と略す) および 1-(5-oxohexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (以下 OHCFU と略す) 等を経て 5-FU を遊離することが知られている^{1,2,3)}。HCFU のすぐれた抗癌性は代謝の結果生じた 5-FU に由来するものと考えられているが、中間酸化代謝物を含めこれら薬剤の生体内動態を知ることは、その薬効および副作用を把握するためにも重要なことである。

これら化合物の生体試料中濃度をそれぞれ測定する方法として、薄層クロマトグラフィーで分取後バイオアッセイ法で測定する方法⁴⁾、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分取後ガスクロマトグラフィー (GLC) で測

定する方法⁵⁾、あるいは直接 HPLC で定量する方法^{6,7)}、などが報告されている。しかし、前者の 2 分取法はルーチンに使用する分析法としては操作が繁雑であり、また後者の HPLC 法では生体成分との分離あるいは感度等に問題がある。

一方、ルーチン分析法としては、抗菌活性を指標とした測定法 (バイオアッセイ法) が報告されている^{4,7)}。この方法は高価な分析機器を必要とせず、また、抗菌活性を対象とする点でユーラクでありそれなりのメリットを有する反面、比較的大量の試料を必要とし、分析操作にも長時間を要するなどのほかに、抗菌活性を示す他剤との併用投与時の試料を扱う場合正確な測定ができないという根本的な欠点を有する。

そこで今回、体液性試料について他の抗菌物質等の影響を受けず、かつ、ルーチン分析に使用できる分析法の開発を目的とし、HPLC, ECD-GLC により、HCFU, 5-FU および両化合物を含めた 5-FU 骨格を有する全代謝物 (以下、総 5-FU と称す) の 3 成分についての濃度測

Fig. 1 Possible metabolic pathways of HCFU cited from T. KOBARI *et al*¹⁾.

定法について検討したので報告する。

1. 実験材料および方法

1. 標準化合物および試薬

標準化合物: 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) は三井東洋化学株式会社中央研究所で合成したものを、5-fluorouracil (5-FU) は PCR 社 (米国) から購入したものを使用した。

内部標準化合物 (Internal Standard, I.S.): HPLC の I.S. には三井東洋化学株式会社中央研究所で合成した 1-heptylcarbamoyl-5-fluorouracil (以下 HpCFU と略す) を、ECD-GLC の I.S. には Sigma Chemical 社 (米国) から購入した 5-bromouracil (以下 5-BU と略す) を使用した。

クロロメチルジメチルシリル化試薬としては市販品 (東京化成) の 1,3-bis (chloromethyltetramethyl-disilazane) および chloromethyldimethylchlorosilane を蒸留し、ベンゼンで希釈して使用した。他の試料類はすべて市販特級品を用い、必要に応じて蒸留あるいはミリポアフィルター (HA type, 0.45 μm; Millipore Corporation, 米国) でろ過して使用した。

2. 血清試料

分析法の検討には健康人数名から得た血清を混合して用いた。また、HCFU 投与後の血中濃度測定には、HCFU 錠剤あるいは細粒剤をいずれも 600 mg (9~13 mg/kg) 服用した患者の血清を用いた。いずれの血清も少量の濃塩酸で酸性にした後、分析時まで冷凍保存 (-20°C) した。

3. 薬剤の分別抽出法

(1) HCFU および 5-FU の分別抽出法

あらかじめ I.S (5-BU) 500 mg を添加したフタ付試験管に血清 0.5 ml を採り、水 0.5 ml、濃塩酸 0.1 ml およびクロロホルム 5 ml を加え、15 分間振とう後 3,000 rpm で 10 分間遠心分離しクロロホルム層と水層および沈渣とに分画する。

クロロホルム層については、さらに I.S (HpCFU) 500 ng を添加し無水硫酸ナトリウム 0.5 g を加えて脱水後、40°C 以下で窒素ガスによりクロロホルムを留去する。得られた残渣を 50 μl のメタノールに溶解し、その 6~10 μl を高速液体クロマトグラフ (HPLC) に注入して HCFU の測定を行なう。

水層および沈渣については、さらに水 0.5 ml を加えて懸濁し遠心分離により水層を得、XAD-2 樹脂 0.5 ml とともに 15 分間振とう後水層を分取する。水層は等量 (v/v) のエーテルで 5 分間振とう洗浄し、さらに酢酸エチル 5 ml を加えて 15 分間振とうする。遠心分離後酢酸エチル層を分取し窒素ガスにて酢酸エチルを留去する。得られた残渣に 1,3-bis (chloromethyltetramethyl-disilazane) および chloromethyldimethylchlorosilane の各 10% ベンゼン溶液を 50 および 25 μl 添加し、90°C で 60 分間反応させてクロロメチルジメチルシリル化した後、溶媒および余剰試薬を窒素ガスにて留去し 200 μl の酢酸エチルに溶解して、その 1~2 μl をガスクロマトグラフ (ECD-GLC) に注入して 5-FU の測定を行なう。

(2) アルカリ分解後の総 5-FU の抽出法

I.S (5-BU) 500 ng を添加したフタ付試験管に血清 0.25 ml を採り、水 0.1 ml および 0.1 N NaOH 0.5 ml を加え、水溶液中に 50°C で 10 分間加熱し、HCFU および中間酸化代謝物を 5-FU に分解する。反応液は冷却して等量 (v/v) のエーテルで 5 分間振とう洗浄した後塩酸性とし、クロロホルム 5 ml を加えて 15 分間振とう

Fig. 2 Fractionation procedure of HCFU and 5-FU in serum

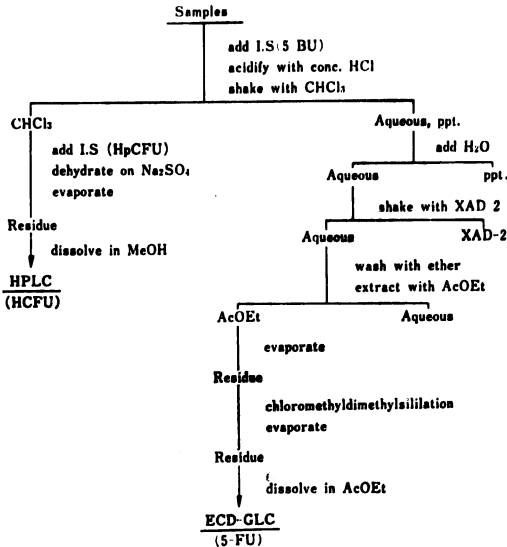
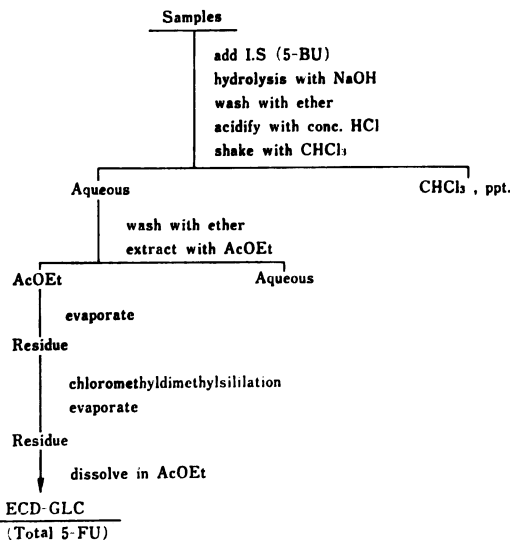


Fig. 3 Extraction procedure of total 5-FU after hydrolysis of HCFU and its metabolites having a 5-FU nucleus in serum



する。それを 3,000 rpm で 20 分間遠心分離し、得られた水層を再度等量 (v/v) のエーテルで洗浄し、酢酸エーテルで 5-FU を抽出して前項(1)と同様 5-FU の測定を行なう。

以上の標準操作法を Fig. 2 および Fig. 3 に示す。

4. 測定方法および条件

高速液体クロマトグラフィー (HPLC): M 6000 A 定流量ポンプ, U 6 K インジェクターおよび M 440 UV 吸収 (254 nm) 検出器を備えた Waters 社製 ALC/GPC-204 型高速液体クロマトグラフを用い、次の条件下で測定した。

カラム; μ Bandapak C₁₈ (3.9 mm I. D × 30 cm)

移動相; メタノール: 水 (60:40, v/v)

流量; 1.5 ml/min

ガスクロマトグラフィー (ECD-GLC): ⁶³Ni を線源とする電子捕獲型検出器 (ECD) 付日電バリアン 1400 型ガスクロマトグラフを用い、次の条件下で測定した。

カラム; 3% OV-1/Gas Chrom Q (100-120 ムッシュ)

(ガラス, 1 mm I. D × 3 m)

移動相; 高純度窒素ガス, 20 ml/min

インジェクター温度; 240°C

カラム温度; 215°C

ディテクター温度; 290°C

Table 1. Recovery rate of HCFU and 5-FU from human serum

Amount of compound added (ng/ml)	Recovery (%)	
	HCFU	5-FU
HCFU 200	86.0 ± 1.3	
800	82.5 ± 2.1	
1,500	83.2 ± 1.9	
5-FU 100		80.1 ± 2.5
300		78.5 ± 2.1
500		82.1 ± 3.1

Each value represents the mean ± S. D from three experiments.

Table 2. Recovery rate of total 5-FU from human serum after hydrolysis of HCFU

Amount of HCFU added (ng/ml)	Recovery* (%)
200	78.1 ± 3.1
1,200	80.0 ± 2.4
2,000	77.5 ± 3.2

* Calculated as HCFU equivalent.

Each value represents the mean ± S. D from three experiments.

5. 薬剤の回収率

血清に標準薬剤を添加し、上記方法により HCFU, 5-FU および総 5-FU を分別抽出しそれぞれの回収率を求めた。HCFU の回収率は HPLC に注入する直前に、5-FU および総 5-FU の場合はクロロメチルジメチルシリル化する直前にそれぞれ対応する I.S を添加し、得られた測定値を標準検量線（一定量の標準化合物および I.S から作成したもの）により算出して求めた。結果を Table 1 および 2 に示したが、いずれの場合も再現性が良く 77% 以上の回収率が得られた。

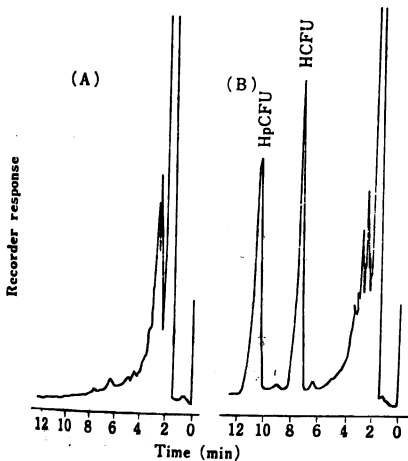
6. 検量線の作成

HCFU, 5-FU および総 5-FU の検量線は、それぞれ既知量を血清に添加し、前項 3, 4 に述べた方法によって測定を行ない、以下のようにして求めた。すなわち、HPLC 法および ECD-GLC 法により得られたクロマトグラムを、それぞれデータ処理装置 (Chromatopak E1 A, Shimadzu) により処理して I.S のピーク面積に対する測定薬剤のピーク面積の比を求め、その値を薬剤の添加濃度に対してプロットしそれぞれの検量線を作成した。なお、いずれの場合も 1 濃度につき 4~5 点のサンプルを測定し、グラフ上へのプロットはその平均値を用いた。

7. パイオアッセイ法による薬剤の濃度測定法

HCFU 画分 (HCFU および中間酸化代謝物) と 5-FU とに分画し測定する渡辺ら⁴⁷⁾の方法に準じて行なった。

Fig. 4 High-performance liquid chromatograms of (A) a blank serum sample (0.5 ml) and (B) an extract of a blank serum sample (0.5 ml) supplemented with HCFU (200 ng) and HpCFU (500 ng).



2. 実験結果

1. HPLC による HCFU の定量

HCFU 添加血清から Fig. 2 に示した抽出法により HCFU を抽出し HPLC にて測定した。得られたクロマトグラムを Fig. 4 に示したが、HCFU および I.S の HpCFU とともに単一ピークを示し、対照血清ではこれらの保持時間に妨害ピークは認められなかった。

既知量の HCFU を血清に添加して求めた検量線を Fig. 5 に示したが、50~2,000 ng/ml の濃度範囲で 1 次式:

$$y = 0.02 + x/1022, r^2 = 1.00$$

(x : HCFU 濃度, y : ピーク面積比, r : 相関係数) で表わされる良好な直線関係が得られた。この方法によって検出できる HCFU 濃度の下限は 20 ng/ml であった。

2. ECD-GLC による 5-FU の定量

5-FU 添加血清から Fig. 2 に示した抽出法により 5-FU を抽出しクロロメチルジメチルシリル化した後 ECD-GLC にて測定した。得られたクロマトグラムを Fig. 6 に示したが、5-FU および I.S の 5-BU とともに単一ピークを示し、対照血清ではこれらの保持時間に妨害ピークは認められなかった。

既知量の 5-FU および 5-BU を血清に添加して求めた検量線を Fig. 7 に示したが、20~600 ng/ml の濃度範囲で 1 次式:

$$y = 0.004 + x/909, r^2 = 1.00$$

(x : 5-FU 濃度, y : ピーク面積比, r : 相関係数) で表わされる良好な直線関係が得られた。この方法によって検出できる 5-FU 濃度の下限は 10 ng/ml であった。

3. ECD-GLC による総 5-FU の定量

HCFU および 5-FU 骨格を有する全中間酸化代謝物がアルカリ性条件下で加温することにより容易に 5-FU に転換されることはすでに報告したとおりである⁴⁷⁾。

Fig. 5 Calibration curve for HCFU extracted from serum I.S : HpCFU 1,000 ng/ml

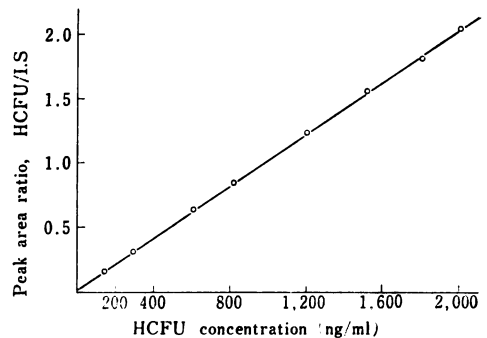


Fig. 6 Gas-liquid chromatograms of (A) a blank serum sample (0.5 ml) and (B) an extract of a blank serum sample (0.5 ml) supplemented with 5-FU (250 ng) and 5-BU (500 ng).

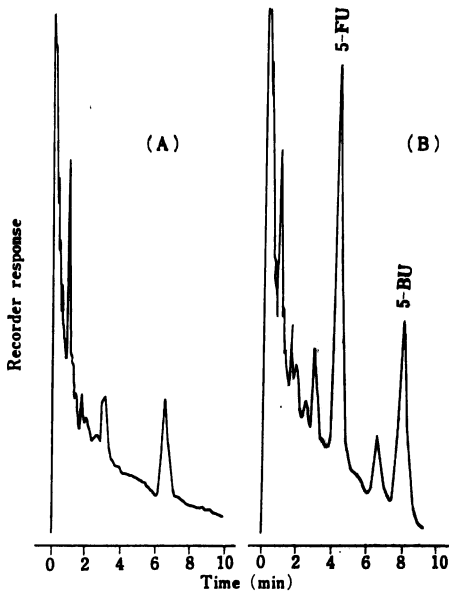


Fig. 8 Gas-liquid chromatograms of (A) a blank serum sample (0.25 ml) and (B) an extract of a blank serum sample (0.25 ml) supplemented with HCFU (300 ng) and 5-BU (1,000 ng).

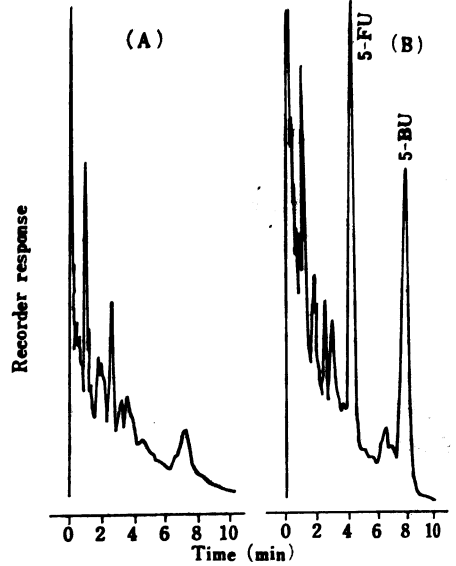


Fig. 7 Calibration curve for 5-FU extracted from serum I.S : 5-BU 1,000 ng/ml

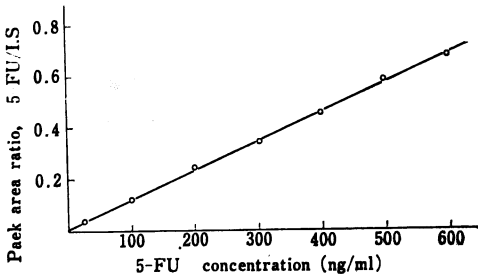


Fig. 9 Calibration curve for 5-FU extracted from serum after hydrolysis of HCFU I.S : 5-BU 2,000 ng/ml

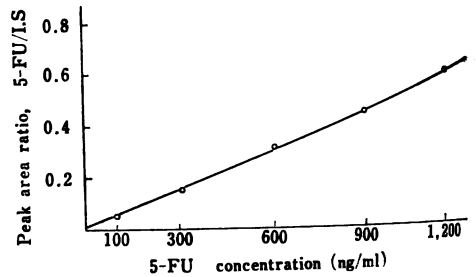


Fig. 8 には、添加薬剤として HCFU を使用し Fig. 3 の方法により得られたクロマトグラムを示した。5-FU および I.S の 5-BU とともに単一ピークを示し、対照血清ではこれらの保持時間に妨害ピークは認められなかった。

既知量の HCFU および 5-BU を血清に添加して求めた検量線を Fig. 9 に示したが、5-FU として 100~1,200 ng/ml の濃度範囲で 1 次式：

$$y = 0.01 + x/2079, r^2 = 1.00$$

(x : 5-FU 濃度, y : ピーク面積比, r : 相関係数) で表わされる良好な直線関係が得られた。他の中間酸化代

謝物を用いた場合も同様に良好な結果が得られた。この方法によって検出できる 5-FU 濃度の下限はいずれの場合も 20 ng/ml であった。

5. バイオアッセイ法との相関

HCFU を服用した患者から得られた血清中の薬剤濃度を本定量法とバイオアッセイ法⁴⁾とにより測定した結果を Table 3 に示した。また、両法による 5-FU および総 5-FU の測定値の相関関係を Fig. 10 および 11

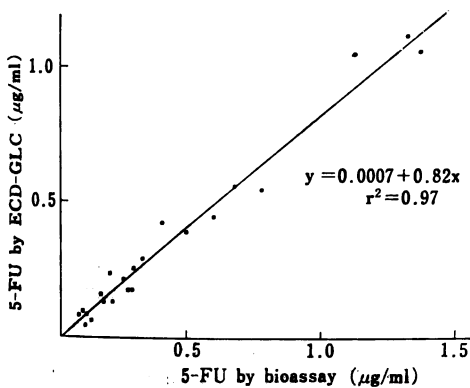
Table 3. Comparison of serum concentrations of drugs assayed by HPLC (HCFU), GLC (5-FU and total 5-FU) and bioassay (HCFU fr. and 5-FU)

Patients	Time after adminis.	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)					
		HPLC	GLC	GLC	Bioassay		
		HCFU	5-FU	Total 5-FU	HCFU fr*	5-FU	Total 5-FU**
E. T	2:35	0.81	0.29	1.27	2.47	0.33	1.57
E. T	2:00	1.38	0.55	1.70	2.93	0.68	2.15
K. I	2:00	2.19	0.13	1.50	2.67	0.17	1.51
T. S	2:00	1.65	0.17	1.23	1.83	0.27	1.19
I. M	1:35	4.09	0.54	2.35	5.13	0.78	3.35
S. T	2:01	0.25	0.05	0.55	0.99	0.13	0.63
S. Y	1:50	0.08	0.16	0.40	0.70	0.16	0.51
S. Y	1:50	0.10	0.25	0.38	0.67	0.19	0.53
Y. A	3:08	1.17	0.44	1.50	2.40	0.39	1.59
S. T	1:58	0.07	0.07	0.10	0.22	0.07	0.18
S. T	2:48	0.08	0.09	0.19	0.41	0.06	0.27
K. S	3:25	0.52	0.17	1.19	2.33	0.28	1.45
K. E	3:55	0.38	0.03	0.44	0.95	0.11	0.59
K. E	2:24	1.36	0.21	1.63	3.47	0.26	2.00
E. T	3:00	0.36	0.08	0.50	1.04	0.10	0.62
N. A	3:40	0.94	0.25	1.36	2.18	0.29	1.38
T. K	1:45	1.43	1.04	2.84	4.32	1.12	3.28
K. Y	3:40	0.55	0.13	0.71	1.32	0.21	0.87
T. S	2:30	2.67	1.11	2.61	4.00	1.32	3.32

* This fraction contains HCFU and its oxidative metabolites. The value is represented as HCFU equivalent.

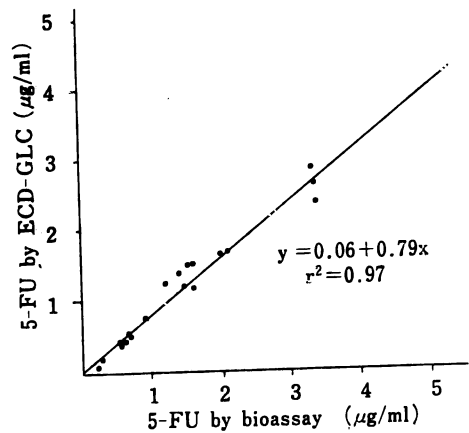
** Total 5-FU concentration is the sum of HCFU fr. (calculated as 5-FU) and 5-FU.

Fig. 10 Correlation between 5-FU concentrations assayed by ECD-GLC and bioassay



に示した。ただしバイオアッセイ法では、本法における総 5-FU に相当するものとして 5-FU と、HCFU 画分を 5-FU に換算したものの合計を求めて比較の対象とした。この結果、両法による測定値は下記の 1 次関係式

Fig. 11 Correlation between total 5-FU concentrations assayed by ECD-GLC and bioassay



に示されるように非常に良好な相関性を示した。

$$5\text{-FU} : y = 0.0007 + 0.82x, r^2 = 0.97$$

$$\text{総 5-FU} : y = 0.06 + 0.79x, r^2 = 0.97$$

(σ : バイオアッセイ法による測定値, ν : 本定量法による測定値, r : 相関係数)

3. 考 察

HCFU およびその代謝物の定量はバイオアッセイ法¹¹⁾, HPLC 法^{5,6)}あるいは HPLC と GC-MS との併用による方法⁹⁾などにより試みられている。5-FU および個々の中間酸化代謝物をすべて分離定量するこれらの方法は、詳細な生体内動態を把握する目的の実験には適しているが、大量の試料を処理するルーチンの臨床試料の分析としては実際的な方法ではない。そこで、通常の生体内動態研究においては HCFU およびその活性代謝物 5-FU の濃度が測定できれば充分と考えられることから、ここでは両化合物の分析法を検討した。さらに、中間酸化代謝物濃度を把握するために、HCFU およびこれら酸化代謝物をアルカリ性条件下で 5-FU に分解し、5-FU 骨格を有する全代謝物濃度を測定する方法をも併せて検討した。

測定手段としては、HCFU および 5-FU を同時に測定することは両者の物性の差などから困難であるため、HCFU はクロロホルムにて抽出後 HPLC を用いて、5-FU はクロロホルム抽出後の水層から XAD-2 樹脂にて分離しクロルメチルジメチルシリル化した後 ECD-GLC を用いてそれぞれ測定することにした。

HCFU の HPLC による分析は KONO ら⁵⁾および中島ら⁶⁾により報告されているが、前者の方法では内部標準物質を使用していないため抽出操作過程での回収率のバラツキ等による測定誤差を生じる危険性があり、後者では、内部標準物質の保持時間が HCFU のそれに比べて速く、溶媒や生体成分の影響を受けやすいなどの問題がある。ここに報告した我々の方法では、側鎖のアルキルカルバモイル基のメチレン基が HCFU より 1 個多い 1-heptylcarbamoyl-5-fluorouracil (HpCFU) を内部標準物質として用いることによってこれらの欠点を補い、測定誤差を最小におさえることができた。

5-FU の測定法に関する報告は多く、バイオアッセイ法⁹⁾, GLC 法 (FID^{10,11)}, NFID¹²⁾, ECD¹³⁾, GC-MS 法^{14,15,16)}, HPLC 法¹⁷⁾および isotachopheresis 法¹⁸⁾などがある。選択性および感度に関しては GC-MS 法が最も優れていると思われるが、装置が高価であり、かつ、機器の保守運用にかなりの労力がかかるなど大量の試料を処理する日常分析には問題が多い。そこで我々は操作の簡便性に優れ感度も良好な ECD-GLC による方法を検討した。はじめに、5-FU を 1,3-bis (chloromethyl)tetramethyldisilazane) および chloromethyldimethylchlorosilane で反応させクロルメチルジメチルシリル化して ECD-GLC により測定する VAN DEN BERG ら¹³⁾の方法

を過試したが、本法では試薬による検出器の飽和を除く目的で測定時に大量の酢酸エチルで希釈しているため、感度の低下をきたし、さらに内部標準物質の thymine と 5-FU との分離が良好でないことが判明したので、若干の改良を試みた。すなわち、試薬を 10% のベンゼン溶液中で反応させ、反応終了後余剰の試薬を窒素気流にて留去することにより、試薬の影響を消去し検出感度の向上をはかった。つぎに内部標準物質として 5-BU を使用し、5-FU のピークとの良好な分離をみた。また、抽出溶媒として n-プロパノール/エーテル混液のかわりに酢酸エチルを用い、溶媒の留去時間の短縮化をはかった。これらの改良により、操作を簡便化し検出感度を 10 ng/ml まで向上させることができた。

臨床試料分析にあたっては併用させる他の薬剤の影響についても考慮する必要がある。本法がバイオアッセイ法に置き換わり得る方法であるためには抗菌性薬剤の影響を受けない方法でなければならない。そこで、現在兼用されている抗生物質のうち ABPC, TC, CP, CER, CEZ, CEX および CBPC を本法の測定条件下で測定したところ、HPLC および ECD-GLC のいずれのクロマトグラムにおいても測定ピークの保持時間に妨害となるピークは認められず、これらの抗生剤を併用した試料でも測定可能であることが判明した。

以上述べたとおり、検出感度、精度ともにすぐれ、迅速で、しかも抗菌剤等の併用によって影響されることのない分析法を確立することができた。また、本法による測定値はバイオアッセイ法によるそれと非常に良く相関した。尿試料についても同様の検討を行ったが、充分満足できる結果が得られた。従って、本法は HCFU 投与患者の血中、尿中その他の体液中薬剤濃度のルーチン分析法として、バイオアッセイ法に充分置き換わり得る方法であると考えられる。

謝 辞

本研究に際し、HCFU 投与患者試料を快く提供していただきました札幌天使病院外科 中村孝博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) KOBARI, T.: K. TAN, M. KUMAKURA, S. WATANABE, I. SHIRAKAWA, H. KOBAYASHI, A. UZIE, Y. MIYAMA, H. NAMEKAWA & H. YAMAMOTO: Metabolic fate of 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil in rats. *Xenobiotica* 8(9): 547~556, 1978
- 2) KOBARI, T.; Y. IGURO, A. UZIE & H. NAMEKAWA: Metabolism of 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU), a new antitumor agent, in rats, rabbits and dogs. *Current Chemotherapy and Infectious Disease, Proceeding of*

- the 11th International Congress of Chemotherapy and the 19th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Boston, October 1979), J. D. NELSON & C. GRASSE eds., American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 1584~1586, 1980
- 3) 小針孝司, 伊黒美樹, 氏家 章, 滑川 宏, 森研二: 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) の癌患者における代謝および代謝物濃度測定法。薬理と治療 8(4): 69~78, 1980
 - 4) 渡辺周次, 森 研二, 御園 等, 横山昌鶴: 新抗腫瘍性化合物 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) の体液内濃度測定法。Chemotherapy 27(5): 773~785, 1979
 - 5) KONO, A.; M. TANAKA, S. EGUCHI, Y. HARA & Y. MATSUSHIMA: Determination of 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil and its metabolites in biomedical specimens by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 163: 109~113, 1979
 - 6) KONO, A.; Y. HARA, S. EGUCHI, M. TANAKA & Y. MATSUSHIMA: Determination of two new metabolites of 1-hexylcarbamoyl in biomedical specimens by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 182: 125~129, 1980
 - 7) 渡辺周次, 森 研二, 御園 等, 横山昌鶴: 新抗腫瘍性化合物 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) の臓器内濃度測定法。Chemotherapy 28(6): 816~824, 1980
 - 8) 中島 修, 今村幸雄, 小山善之: 第 16 回日本癌治療学会抄録集 239 頁, 1978
 - 9) 藤田 浩, 向島 達, 中山 昇, 沢部孝昭, 土田裕子, 青木光子: 抗癌剤の Bioassay について。メディアサークル 92: 259~270, 1967
 - 10) COHEN, J. L. & P. B. BRENNAN: GLC assay for 5-fluorouracil in biological fluids. J. Pharm. Sci. 62(4): 572~575, 1973
 - 11) RAO, K. V.; K. KILLION & Y. TANRIKUT: GLC Determination of fluorouracil. J. Pharm. Sci. 63(8): 1328, 1974
 - 12) FINCH, R. E.; M. R. BENDING & A. F. LANT: Use of a nitrogen detector for GLC determination of fluorouracil in plasma during single- and combined-agent chemotherapy. J. Pharm. Sci. 67(10): 1489~1490, 1978
 - 13) VAN DEN BERG, H. W.; R. F. MURPHY, R. HUNTER & D. T. ELMORE: An improved gas-liquid chromatographic assay for 5-fluorouracil in plasma. J. Chromatogr. 145: 311~314, 1978
 - 14) HILLCOAT, B. L.; M. KAWAI, P. B. MCCULLOCH, J. ROSENFELD & C. K. O. WILLIAMS: A sensitive assay of 5-fluorouracil in plasma by gas chromatography-mass spectrometry. Br. J. Clin. Pharmacol. 3: 135~143, 1976
 - 15) FINN, C. & W. SADÉE: Determination of 5-fluorouracil (NSC-19893) plasma levels in rats and man by isotope dilution-mass fragmentography. Cancer Chemother. Rep. Part 1. 59(2): 279~286, 1975
 - 16) LAKINGS, D. B.; R. H. ADAMSON & R. B. DIASIO: Quantitative analysis of 5-fluorouracil in human serum by selected ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. 146: 512~517, 1978
 - 17) SITAR, D. S.; D. H. SHAW, Jr., M. P. THIRLWELL & J. R. RUEDY: Disposition of 5-fluorouracil after intravenous bolus doses of a commercial formulation to cancer patients. Cancer Res. 37: 3981~3984, 1977
 - 18) GUSTAVSSON, B.; A. BALDESTEN, P. HASSELGREN & O. ALMERSJÖ: New assay of 5-fluorouracil in serum by isotachopheresis. J. Chromatogr. 179: 151~159, 1979

METHODS FOR DETERMINATION OF HCFU AND ITS METABOLITES IN HUMAN BODY FLUIDS BY HPLC AND ECD-GLC

KENJI MORI, HIDEYUKI KOBE, HIROSHI NAMEKAWA, HITOSHI MISONO,
YOSHITSURU YOKOYAMA and TAKASHI KOBARI

Institute of Biological Science, Mitsui Pharmaceuticals Inc.

Rapid, sensitive and specific methods for quantitative determination of HCFU and its metabolites in human body fluids were investigated with high-performance liquid chromatograph (HPLC) and gas-liquid chromatograph equipped with electron capture detector (ECD-GLC).

HCFU extracted with chloroform from serum sample was determined by HPLC. 5-FU separated from HCFU and its oxidative metabolites such as CPEFU, CPRFU, HHCFU and OHCFU using Amberlite XAD-2 resin was determined by ECD-GLC after chloromethyltrimethylsilylation.

Furthermore, HCFU and all metabolites having a 5-FU nucleus were converted to 5-FU under alkaline condition, and then determined by ECD-GLC as a total 5-FU.

The lower limits of detection of HCFU, 5-FU and total 5-FU were 20, 10 and 20 ng/ml, respectively.

There was a close correlation between results by the proposed method and bioassay method.

The methods would be suitable for the routine analysis of clinical samples, especially samples of combination chemotherapy with other drugs such as antibiotics.