

総合論文

蛍光・化学発光反応に基づく高選択的検出法の 開発と生体分析への応用

岸川 直哉¹

生体内に存在する医薬品やバイオマーカーの濃度を測定することは、治療効果の確認や疾患の診断のために重要である。しかしながら、生体に由来する試料中には夾雑物となる生体成分が数多く存在し、これらが測定対象の検出を妨害するという問題点が存在している。著者らは、複雑な生体成分が共存する生体内から、微量の医薬品やバイオマーカーのみを特異的に検出するために、測定対象化合物に特徴的な構造あるいは性質を利用する高選択的かつ高感度な蛍光・化学発光分析法の開発を行い、生体分析の分野においてその有用性を明らかにしてきた。本論文ではその中でも中心的な二つの手法、(1)パラジウムカップリング反応に基づくアリールハライド及び末端二重結合の選択的蛍光誘導体化法及び(2)キノンの選択的蛍光・化学発光定量法について紹介する。

1 はじめに

一般に、医薬化合物は微量であっても薬効や副作用を発現することから、その生体内濃度の測定と動態解析は薬物治療において様々な有用な情報を与える。例えば、医薬品の治療効果の確認や副作用回避のために必要不可欠な血中薬物濃度モニタリングでは経時的に採取した血液試料中の医薬品の濃度を測定することにより、各種薬物動学的パラメーターを算出する手法がとられる。また、疾患の発症・進展に伴ってその生体内濃度が変動するような生体内存在性化合物は、疾患を診断するためのバイオマーカーとして使用可能であり、その微細な濃度変動を明らかにすることは疾患を早期に発見するためにも重要である。しかしながら、多数の生体成分が共存する生体試料中に微量にしか存在しない医薬品やバイオマーカーを測定することは非常に困難である。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) はそのような生体試料中の微量成分を定量するための手段として広く用いられている分析法である。HPLCにおける検出法として、紫外可視吸光、蛍光、化学発光、電気化学検出や質量分析法といった様々な方法が使用されている。そのうち、紫外可視吸光検出法は感度と選択性に劣るという欠点を有する。電気化学検出法は高感度であるが、生体内成分の影響を受けやすいという問題点がある。質量分析に基づく検出法は高感度かつ高選択的ではあるが、装置が非常に高価かつ複雑であることから広く普及していない。

一方で、蛍光・化学発光を利用する方法は、比較的簡便な装置で高感度かつ選択的な定量が可能な検出法として知られている。

蛍光分析法は、励起光の光エネルギーにより励起された分子が基底状態へと遷移する際に発する蛍光を測定する方法であり、吸光度法と比較して高感度かつ選択的であることが知られている。蛍光分析法は、測定対象が非蛍光性あるいは弱蛍光性化合物である場合、これらを強蛍光性化合物へと変換してから分析へと供する蛍光誘導体化という手法が用いられ¹⁾、これまでにアミンやアルデヒドといった様々な官能基を対象とする蛍光誘導体化試薬が数多く開発されている²⁾³⁾。一方、化学発光分析法は化学反応から生じるエネルギーによる分子の励起に基づく光分析法であり、励起光源に由来する迷光や散乱光の影響が存在しないことから蛍光法よりもさらなる高感度化が可能である。これまでに、ルミノール誘導体、アクリジニウムエステル誘導体やシュウ酸エステル類を試薬として用いる反応系に基づく化学発光分析法が多数報告されている⁴⁾。蛍光・化学発光検出器を備えた HPLC システムは、その高い感度と選択性から様々な生体成分や医薬品の測定に広く利用されている。

著者らはこれまでに、様々な生体成分、医薬品や環境汚染物質を対象として多様なアプローチに基づく蛍光・化学発光分析法の開発に関する研究を行ってきた。この研究の過程において、測定対象化合物の有する特異的な構造あるいは性質を利用することにより、複雑な成分が共存する生体中から目的の測定対象のみを極めて選択的に検出可能な蛍光・化学発光分析法を多数報告している。本稿では、そ

E-mail: kishika@nagasaki-u.ac.jp

¹ 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻: 852-8521
長崎県長崎市文教町 1-14

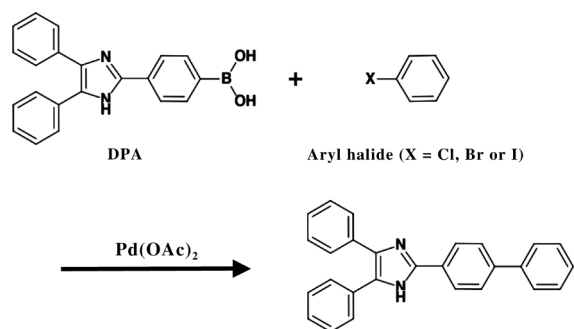


Fig. 1 Fluorescence derivatization of aryl halide with fluorescent aryl boronic acid, DPA based on Suzuki coupling reaction

の中で中心的な二つの手法である (1) パラジウムカップリング反応に基づく選択的蛍光誘導体化及び (2) キノンの選択的蛍光・化学発光定量法について得られた成果について紹介する。

2 パラジウムカップリング反応に基づく選択的蛍光誘導体化法の開発

パラジウムカップリング反応はパラジウム錯体を触媒として炭素-炭素結合を形成させる反応であり、二つの分子を容易に連結することが可能であることから、医薬品をはじめとする様々な有機化合物の合成に広く利用されている^{6)~9)}。2010年のノーベル化学賞はこのパラジウムカップリング反応の研究に対して、鈴木 章博士、根岸栄一博士及び Richard F. Heck 博士に授与された事実は記憶に新しい。著者らはパラジウムカップリング反応の特徴である、選択性が高く副反応が少ない、試薬が安定かつ水の存在下でも反応が良好に進行するといった点に着目し、本反応が生体分析の分野においても有用な手段になると考えた。そこで以下のように、パラジウムカップリング反応に基づく蛍光誘導体化法を開発し、多数の成分が共存する生体試料中から特定の医薬品のみを選択的に検出して定量することに成功した。

2.1 Suzuki coupling 反応に基づくアリールハライドの選択的蛍光誘導体化

蛍光分析法は高感度かつ選択的であることから、様々な医薬品の血中濃度測定に広く利用されている。医薬品の多くは非蛍光性であることから、これらを蛍光性化合物へと変換するための蛍光誘導体化試薬が数多く開発されている。一方、多くの医薬品がアリールハライド構造を有するにもかかわらず、この部位を対象とする蛍光誘導体化試薬はこれまでに開発されてこなかった。また、通常の蛍光誘導体化試薬は医薬品だけではなく、共存する生体成分とも反応し、測定妨害となる副生成物を生じさせるといった問

題点も存在していた。そこで著者らは、Suzuki coupling 反応に基づくアリールハライド型医薬品の選択的蛍光誘導体化法を考案した。Suzuki coupling 反応はパラジウム触媒下でアリールボロン酸とアリールハライドとを選択的に結合させるパラジウムカップリング反応の一種である。したがって、医薬品のアリールハライド部位と蛍光性アリールボロン酸とをパラジウム触媒の存在下で結合させることによりアリールハライド型医薬品の蛍光誘導体化が可能であると考えた (Fig. 1)¹¹⁾。そこで、強蛍光性化合物であるロフィンに反応基としてボロン酸を導入した化合物 4 (4,5-ジフェニル-1*H*-イミダゾール-2-イル)フェニルボロン酸 [4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)phenylboronic acid, DPA]¹⁰⁾を試薬として選択し、蛍光誘導体化法の確立を試みた。

最初に、プロモベンゼンやプロモトルエンといった単純な構造のアリールプロミド類を対象として基礎検討を行った。その結果、酢酸パラジウムの存在下で加熱を行うことで、DPA はアリールプロミドと結合して蛍光誘導体を与え、高感度にアリールプロミドを蛍光検出可能であることが確認できた。さらに、ハロゲン基の種類が DPA との反応性に与える影響を調査した結果、一般的な Suzuki coupling 反応と同様にヨード基 > プロモ基 > クロロ基の順で DPA との反応性が高いことが明らかとなった。また、ハロゲン基の *o*-位に置換基を有するアリールハライドでは誘導体のピーク高さが低下したことから、立体障害が反応性に影響を与えていると考えられた。

蛍光性アリールボロン酸 DPA によるアリールハライドの蛍光誘導体化が可能であることが明らかになったことから、実際にアリールハライド構造を有する医薬品の生体分析へと本蛍光誘導体化法を応用した。これまでに著者らはクロフィブラート¹¹⁾、ハロペリドール¹²⁾、ヒドロキシジン¹³⁾やセチリジン¹³⁾といった様々なアリールハライド型医薬品を対象として、DPA を誘導体化試薬として用いる高感度 HPLC 蛍光定量法を開発することに成功している。その一例として、ヒト血清中ハロペリドールを分析して得られるクロマトグラムを Fig. 2 に示している。血清中のハロペリドール及びその代謝物である還元型ハロペリドールはそのクロロ基を介して DPA により誘導体化され、検出されている。このとき、ほとんどの生体成分はアリールハライド構造を有していないことから DPA と反応せず、副生成物に由来する妨害ピークはクロマトグラム上に検出されていない。このように、本誘導体化法の利用により複雑な成分が共存する生体試料中から測定対象医薬品のみを選択的に検出することが可能であった。

次に、アリールハライドのさらなる高感度定量を目的として、DPA により蛍光誘導体化した医薬品の過シュウ酸エステル化学発光検出法の開発を行った。過シュウ酸エステ

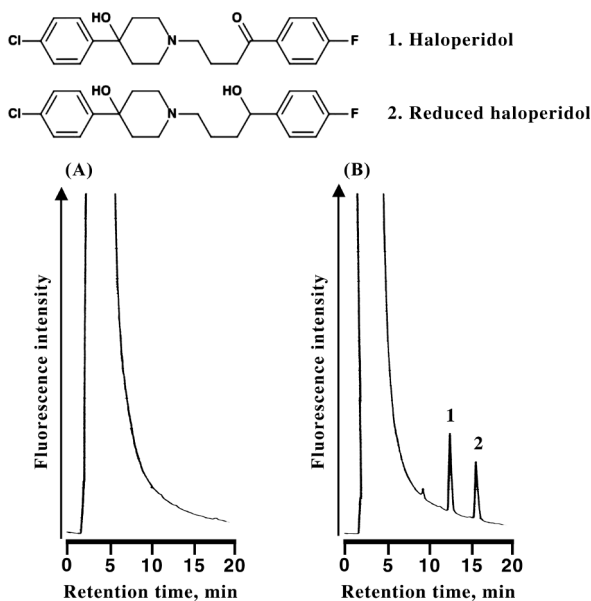


Fig. 2 Chromatograms of (A) human serum and (B) human serum spiked with standard haloperidol (94 ng/mL) and reduced haloperidol (94 ng/mL)

Peaks : 1, haloperidol ; 2, reduced haloperidol.

ル化学発光は、シウ酸エステルと過酸化水素との反応により活性中間体が生じ、この中間体のエネルギーが共存する蛍光物質へと移動することにより蛍光物質が励起され、発光が生じるという反応である。過シウ酸エステル化学発光検出法は励起光の照射なしに蛍光物質を発光させることが可能な方法であることから、蛍光検出よりも高感度であることが知られている。そこで、DPAで誘導体化した医薬品クロルフェニラミンについて、HPLCカラムで分離後にシウ酸エステルと過酸化水素からなる化学発光試薬と混合して発光を生じさせ、定量を行う方法の開発を行った。その結果、過シウ酸エステル化学発光検出法の採用により、蛍光検出法と比較しておよそ10倍程度高感度にクロルフェニラミンを定量できることが明らかとなった¹⁴⁾。

以上のように、DPAはアリールハライド型医薬品の高感度かつ選択的な生体分析に有用であることが確認された。しかし、DPAはそれ自身強い蛍光を有するためにクロマトグラム上に大きなブランクピークを与えるという欠点を有し、誘導体化された医薬品と試薬ブランクとの複雑な分離を必要としていた。そこで、この欠点を克服するために著者らは、アリールハライドの発光誘導体化法の開発を行った¹⁵⁾。すなわち、最も単純かつ無蛍光性である無置換フェニルボロン酸を試薬として用い、アリールハライドを蛍光性ビフェニルへと変換するという方法である。アリールハライドのモデルとして*p*-位に様々な置換基を有するアリールプロミド類を対象として、フェニルボロン酸との

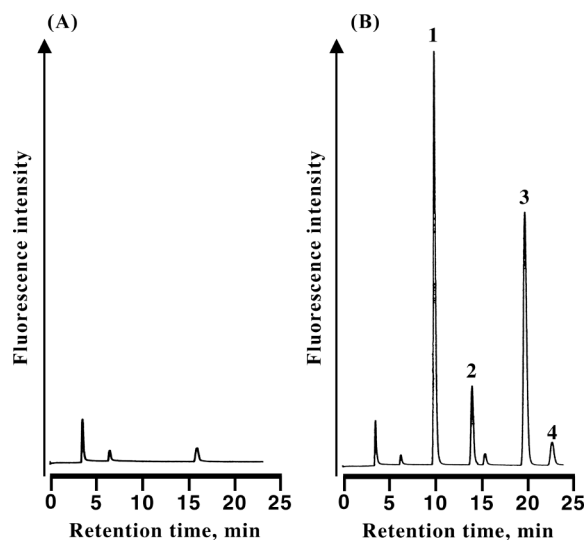


Fig. 3 Chromatograms of (A) reagent blank and (B) reaction mixture of aryl bromides (25 μM) with phenylboronic acid

Peaks : 1, *p*-bromobenzonitrile ; 2, *p*-bromoanisole ; 3, *p*-bromobenzoic acid ethyl ester ; 4, *p*-bromotoluene.

反応後の蛍光強度を測定した。その結果、試薬であるフェニルボロン酸及びアリールプロミドはどちらも蛍光性を示さなかった一方で、これらの反応溶液は励起波長275~290 nm及び蛍光波長315~350 nmの蛍光を発することが確認された。この反応溶液を逆相HPLCシステムに注入したところ、過剰の誘導体化試薬に由来する試薬ブランクピークはほとんど検出されず、4種のアリールプロミド誘導体を良好に蛍光検出することが可能であった (Fig. 3)。

2.2 Mizoroki-Heck coupling 反応に基づく末端二重結合に対する選択的蛍光誘導体化

最近、著者らは Suzuki coupling 反応と同様にパラジウムカップリング反応の一種である Mizoroki-Heck coupling 反応に基づく末端二重結合の新規蛍光誘導体化法を報告した¹⁶⁾。Mizoroki-Heck coupling 反応は、パラジウム触媒下でアリールハライドと末端二重結合とを選択的に結合させる反応である。著者らは、ロフィンとアリールヨードをそれぞれ蛍光団と反応基として有する蛍光試薬 4(4,5-ジフェニル-1*H*-イミダゾール-2-イル)ヨードベンゼン [4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)iodobenzene, DIBI] を設計・合成し、これを用いて末端二重結合を有する医薬品アルプレノロールの蛍光誘導体化 HPLC 定量法を開発した (Fig. 4)。DIBI は末端二重結合を有する化合物のみを蛍光誘導体化し、ほとんどの生体成分と反応しないことから、クロマトグラム上にアルプレノロール及びその誘導体以外のピークは検出されず、選択的にアルプレノロールを定量可能であった (Fig. 5)。さらに、DIBI は末端二重結合部と

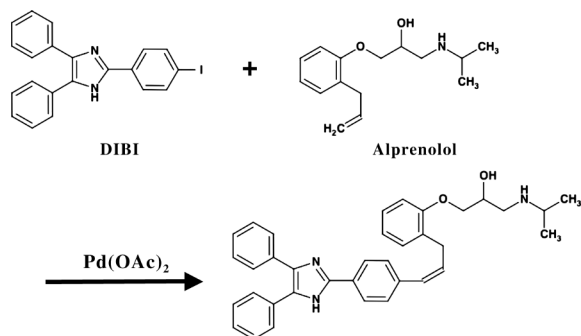


Fig. 4 Fluorescence derivatization of terminal double bond of alprenolol with fluorescent aryl iodide, DIBI based on Mizoroki-Heck coupling reaction

反応することにより、蛍光強度が増大するとともに蛍光極大波長が長波長側にシフトすることが確認された。この理由として、誘導体化反応により共役系が延長することやDIBIからのハロゲン脱離に伴って重原子効果が解消すること等が考えられた。

以上のように、パラジウムカップリング反応に基づく蛍光誘導体化法は多数の生体成分の共存下であっても選択的に医薬品の特異的構造を認識して誘導体化することから、有機溶媒による液液抽出という単純な前処理操作のみで生体試料中の夾雑成分きょうざつに由来する妨害を全く受けずに医薬品のみを選択的に検出することが可能であった。また、蛍光・化学発光法による高感度検出は液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法(LC-MS/MS)といった他の分析法と比較してより少ない試料量での医薬品分析を可能とした。したがって、本誘導体化法は薬物血中モニタリングのための有用な手段になり得ることが明らかにされた。

3 キノンの選択的蛍光・化学発光定量法の開発

キノンは生体にとって様々な効果をもたらす興味深い化合物である。例えば、ユビキノンは生体内の電子伝達系に大きく関与することが知られているほか、抗酸化効果を有することも知られている¹⁷⁾。また、フィロキノンやメナキノンは血液凝固や骨硬化に関係しており、ビタミンKとして知られている¹⁸⁾。このように重要な機能を有する生体内在性キノンを以外にも、キノンは様々な産業上の用途のために製造・利用されている。例えば、抗腫瘍薬としてがん治療のために臨床的に用いられているキノンとしてドキシソルピシンがあり¹⁹⁾、染料、漂白剤あるいは農薬として使用されているキノンも存在する²⁰⁾。このような有用な機能を有するキノンも存在する一方で、生体に対して種々の有害作用をもたらすキノンも環境中に見いだされている。代表的な有害性キノンとしては、9,10-フェナンスレンキノンはじめとする多環芳香族炭化水素キノンがある。多環芳

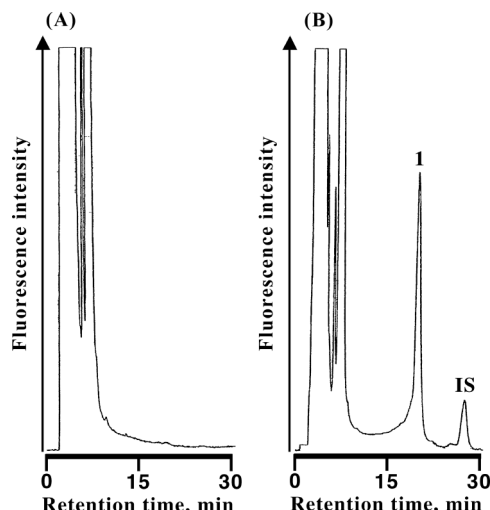


Fig. 5 Chromatograms of (A) blank rat plasma and (B) rat plasma after administration of alprenolol
Peaks : 1, alprenolol ; IS, *N,O*-dimethylated alprenolol.

香族炭化水素キノンは化石燃料の不完全燃焼等により発生する環境汚染物質の一種であり、生体に酸化的ダメージをもたらすことや種々の酵素の活性を阻害することが報告されている^{21)~23)}。このような背景から、キノン濃度の測定は様々な分野において必要とされており、そのために選択的かつ高感度なキノンの定量法の開発が求められている。

著者らはキノンに特徴的な性質を利用することで、選択的かつ高感度なキノンの蛍光・化学発光定量法を開発し、生体及び環境試料中に含まれる様々なキノンの定量へと応用してきた。

3.1 キノンの酸化還元サイクルを利用するルミノール化学発光定量

9,10-フェナンスレンキノンといった有害性キノンは、生体内の酸化還元酵素の働きにより不安定なセミキノンラジカルへと還元され、これが再び元のキノンへと酸化される過程で溶存酸素を活性酸素へと変換するという酸化還元サイクルを有している。このキノンの酸化還元サイクルを通じて発生する活性酸素が生体へと種々の酸化的ダメージを与えることが知られている²¹⁾。一方で、ルミノール等の化学発光試薬は活性酸素と反応することにより強い発光を生じることから活性酸素の測定に用いられている²⁴⁾。著者らはこれらの知見に基づいて、キノンの毒性発現機構を利用するキノンの化学発光定量法の開発を行った。すなわち、キノンに還元剤を添加することで酸化還元サイクルを誘起させ、これに伴って発生する活性酸素をルミノールにより化学発光検出するという原理に基づく方法である (Fig. 6)²⁵⁾。キノンとルミノールの混合溶液に、還元剤としてジチオスレイトール (DTT) を添加することでキノン濃度に依存的

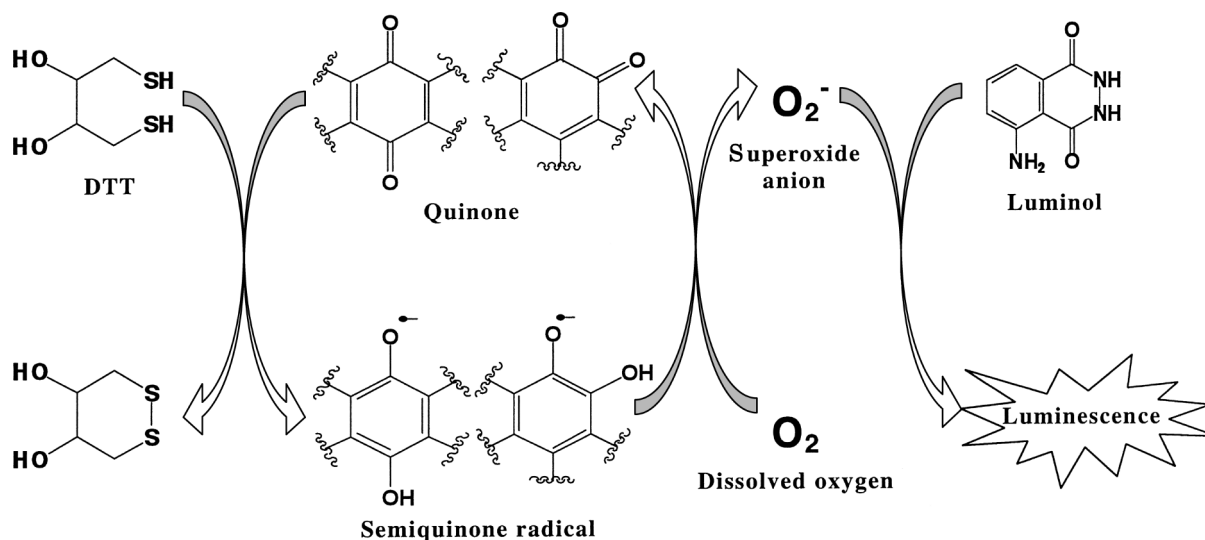


Fig. 6 Chemiluminescence assay for quinones based on the generation of reactive oxygen species through the redox cycle of quinone

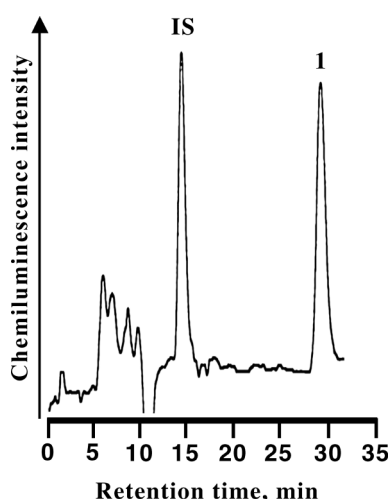


Fig. 7 Chromatogram of ubiquinone (0.40 $\mu\text{g/mL}$) in human plasma

Peaks : 1, ubiquinone ; IS, 2-henicosyl-1,4-naphthoquinone.

かつ長時間持続する発光が観察された。この発光はキノンと DTT が共存するときのみ生じ、発光強度とキノン濃度との間には良好な直線関係が認められた。この化学発光は 9,10-フェナンスレンキノン等の有害性キノンのみならず、ユビキノンやビタミン K 類といった生体内で重要な働きを担っているキノンでも同様に観察された。著者らはこの発光反応を利用して、製剤中ユビキノンの簡便かつ迅速な測定法を開発している²⁵⁾。本法の測定時間は 1 検体あたり 30 秒ときわめて迅速であり、日本薬局方収載の HPLC 定量法と比較して 20 分の 1 の測定時間であった。

さらに、この発光反応を組み込んだ HPLC-化学発光検出システムにより血漿試料中のユビキノンの定量を行っ

た²⁶⁾。本システムは、カラムから溶出したユビキノンをルミノール及び DTT 溶液と HPLC のライン上で混合し、生じる発光を検出するシステムであり、共存する生体成分の影響を受けることなくヒト血漿中のユビキノンを選択的に定量可能であった (Fig. 7)。

3.2 紫外線照射を利用するキノンの過シュウ酸エステル化学発光定量法

過シュウ酸エステル化学発光は過酸化水素あるいは蛍光物質の高感度検出に利用されている。しかしながら、キノンはそれ自身シュウ酸エステルとは反応せず、また蛍光性は極めて弱いことから、通常過シュウ酸エステル化学発光による検出は不可能である。一方で著者らは、紫外線照射後のキノンの溶液をシュウ酸エステルと混合することで、キノン濃度に応じた強い発光が生じることを見いだした。この化学発光反応の機構について調査したところ、キノンに紫外線を照射することで過酸化水素をはじめとする活性酸素が発生すると同時に蛍光性を有する 3,6-ジヒドロキシフタル酸が生成していることが明らかにされ、これらがシュウ酸エステルと反応することで発光が生じていると考えられた (Fig. 8)²⁷⁾。そこで、この発光反応に基づいて、カラムで分離後のキノンにオンラインで紫外線を照射後、シュウ酸エステルのみを含む溶液と混合し、生じる発光を検出するというキノンの HPLC 定量法の開発を行った²⁷⁾。紫外線照射により過酸化水素と蛍光物質を同時に生成するという性質はキノンに特徴的であることから、本法は生体試料中のキノンを極めて選択的に定量することが可能であった。実際に本法はヒト血漿中のビタミン K 類の定量²⁸⁾や抗がん剤ドキシソルビシン及びその代謝物ドキシソルビシノールのラット血中濃度モニタリング²⁹⁾へと応用されている。

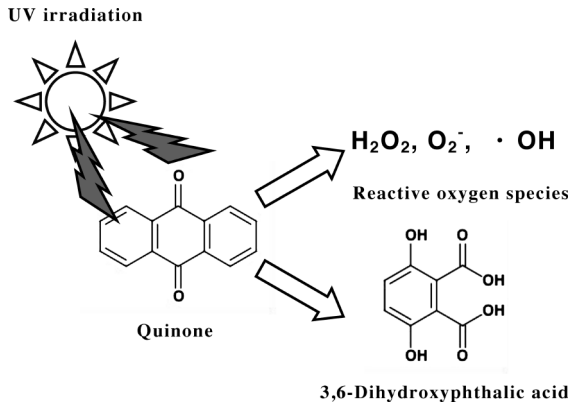


Fig. 8 Generation of reactive oxygen species and 3,6-dihydroxyphthalic acid from quinone by ultraviolet irradiation

3.3 紫外線照射を利用するキノンのルミノール増感化学発光定量法

さらに、上記研究を進める過程においてキノンの光分解産物である3,6-ジヒドロキシフタル酸がルミノール化学発光反応の効果的な増感剤としての機能を有することを見いだした。そこで、紫外線照射によりキノンの発生した活性酸素がルミノール誘導体と反応して生じる化学発光を、同じくキノンの発生した3,6-ジヒドロキシフタル酸が増感するという原理に基づくキノンのルミノール化学発光定量法の開発を行った³⁰⁾。本法は前述の紫外線照射-過シュウ酸エステル化学発光法と比較して、数十倍程度高感度にキノンを定量可能であった。さらに著者らは、本法を関節リウマチ患者血漿中のビタミンK類の定量へと応用することにより (Fig. 9)、関節リウマチの進行に伴って血中メナキノンの(ビタミンK₂)濃度が減少するという臨床化学的に興味深い知見を得ている³¹⁾。

3.4 キノンの発光誘導体化定量法

一般に、キノンは蛍光性が極めて弱いことから、そのままの形では高感度な蛍光定量は困難である。そこで、著者らは有害性キノンの9,10-フェナンスレンキノンを主な対象とする発光誘導体化反応を考案し、これを利用する9,10-フェナンスレンキノンの選択的かつ高感度な蛍光定量法を開発した。最初に、9,10-フェナンスレンキノンのベンズアルデヒド及び酢酸アンモニウムと縮合することにより、強蛍光性ベンズイミダゾールが生成する反応を利用して9,10-フェナンスレンキノンのプレカラム蛍光誘導体化HPLC定量法を開発した³²⁾。本法を大気粉じん試料中の9,10-フェナンスレンキノンの定量へと応用することにより、季節変動をはじめとする詳細な環境内動態を初めて明らかにしている³³⁾。さらに、誘導体化試薬としてベンズアルデヒドに代えて4カルボメトキシベンズアルデヒドを

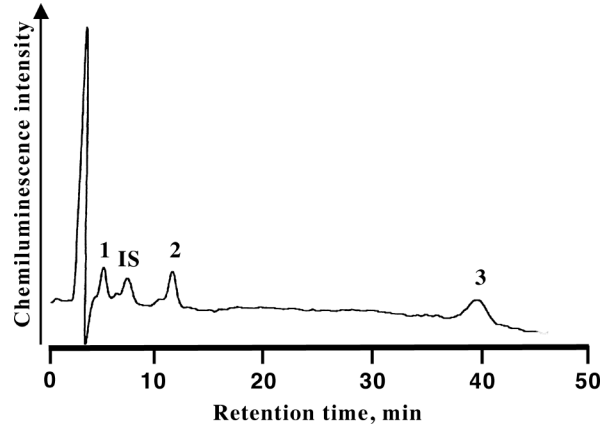


Fig. 9 Chromatogram of vitamin K analogues in plasma from rheumatoid arthritis patients

Peaks: 1, menaquinone-4; 2, phylloquinone; 3, menaquinone-7; IS, 2-methyl-3-pentadecyl-1,4-naphthoquinone.

用いることで感度と選択性を向上させた改良型プレカラム蛍光誘導体化定量法³⁴⁾や2-アミノチオフェノールを試薬として用いる9,10-フェナンスレンキノンのポストカラム蛍光誘導体化定量法³⁵⁾の開発にも成功している。これらキノンの発光誘導体化定量法は生体内に存在するキノンの定量にも応用可能であると考えており、有害性キノンの健康影響評価だけでなく生体内で重要な機能を担っているキノンの高選択的定量法開発へと展開可能であると考えている。

4 まとめ

以上のように、著者らは測定対象化合物に特徴的な構造あるいは性質を利用することで、多数の成分の共存下であっても目的とする医薬品やバイオマーカーのみを極めて選択的に測定可能な蛍光・化学発光分析法を開発し、生体試料分析へと応用することで、その高い選択性や優れた感度を実証してきた。本研究で開発した方法は、より少量の血液での薬物濃度モニタリング法や疾患の新規診断法の開発など医療化学や臨床化学をはじめとする様々な分野で有用な手法になっていくと期待される。

謝 辞

本研究に際し、終始懇切丁寧な御指導・御鞭撻を賜りました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科黒田直敬教授に謹んで感謝の意を表します。また、種々の有益な御助言と御指導を賜りました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科中島憲一郎教授に深く御礼申し上げます。本研究において、御協力・御支援頂きました長崎国際大学の大庭義史教授、長崎大学の和田光弘准教授、大山 要助教及び池田理恵助教に心より感謝致します。本研究の遂行にご協力頂きました杉原住香さん、杉原陽子さん、小林千雪さん、Sherin F. Hammadさん、Lawrence A. Adutwum君、久保公子さん、

大熊瑞穂さん、大久保信宏君、藤井 収君、Sameh Ahmed 君、中島 一君、中尾麻衣子さんをはじめとする長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬品分析化学研究室及び医療情報解析学研究室の皆様にご感謝申し上げます。本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金の助成により遂行されました。併せて御礼申し上げます。

文 献

- 1) M. Yamaguchi, J. Ishida : "Modern Derivatization Methods for Separation Sciences : Reagent for FL Detection", Edited by T. Toyooka, p. 99 (1999) (Wiley, Chichester).
- 2) Y. Ohkura, M. Kai, H. Nohta : *J. Chromatogr. B*, **659**, 85 (1994).
- 3) S. Uchiyama, T. Santa, N. Okiyama, T. Fukushima, K. Imai : *Biomed. Chromatogr.*, **15**, 295 (2001).
- 4) A. M. García-Campaña, M. Román-Ceba : "Historical evolution of chemiluminescence", Edited by A. M. García-Campaña, W. R. G. Bayens, p. 2 (2001), (Marcel Dekker Inc., New York).
- 5) N. Kuroda, M. Kai, K. Nakashima : "Chemiluminescence detection in liquid chromatography", Edited by A. M. García-Campaña, W. R. G. Bayens, p. 393 (2001), (Marcel Dekker Inc., New York).
- 6) N. Miyaura, A. Suzuki : *Chem. Rev.*, **95**, 2457 (1995).
- 7) A. Suzuki : *J. Organomet. Chem.*, **576**, 147 (1999).
- 8) T. Mizoroki, K. Mori, A. Ozaki : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **44**, 581 (1971).
- 9) R. F. Heck, J. P. Nolley Jr. : *J. Org. Chem.*, **37**, 2320 (1972).
- 10) N. Kuroda, K. Kawazoe, H. Nakano, M. Wada, K. Nakashima : *Luminescence*, **14**, 361 (1999).
- 11) N. Kuroda, S. Sugihara, Y. Sugihara, M. Wada, N. Kishikawa, Y. Ohba, K. Nakashima : *J. Chromatogr. A*, **1066**, 119 (2005).
- 12) N. Kishikawa, C. Hamachi, Y. Imamura, Y. Ohba, K. Nakashima, Y. Tagawa, N. Kuroda : *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 719 (2006).
- 13) S. F. Hammad, M. M. Mabrouk, A. Habib, H. Elfatry, N. Kishikawa, K. Nakashima, N. Kuroda : *Biomed. Chromatogr.*, **21**, 1030 (2007).
- 14) L. A. Adutwum, N. Kishikawa, K. Ohyama, S. Harada, K. Nakashima, N. Kuroda : *Anal. Bioanal. Chem.*, **398**, 823 (2010).
- 15) N. Kishikawa, K. Kubo, S. F. Hammad, M. M. Mabrouk, A. Habib, H. Elfatry, K. Ohyama, K. Nakashima, N. Kuroda : *J. Chromatogr. A*, **1216**, 6873 (2009).
- 16) N. Kishikawa, M. Ohkuma, M. Wada, K. Ohyama, R. Ikeda, K. Nakashima, N. Kuroda : *J. Chromatogr. A*, **1218**, 3002 (2011).
- 17) K. Overvad, B. Diamant, L. Holm, G. Hølmer, S. A. Mortensen, S. Stender : *Eur. J. Clin. Nutr.*, **53**, 764 (1999).
- 18) M. J. Shearer : *Lancet*, **345**, 229 (1995).
- 19) G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni : *Pharmacol. Rev.*, **56**, 185 (2004).
- 20) A. N. Assimopoulou, D. Boskoub, V. P. Papageorgiou : *Food Chem.*, **87**, 433 (2004).
- 21) Y. Motoyama, K. Bekki, W. C. Sang, N. Tang, T. Kameda, A. Toriba, K. Taguchi, K. Hayakawa : *J. Health Sci.*, **55**, 845 (2009).
- 22) K. Taguchi, M. Shimada, S. Fujii, D. Sumi, X. Pan, S. Yamano, T. Nishiyama, A. Hiratsuka, M. Yamamoto, A. K. Cho, J. R. Froines, Y. Kumagai : *Free Radic. Biol. Med.*, **44**, 1645 (2008).
- 23) K. Taguchi, Y. Kumagai, A. Endo, M. Kikushima, Y. Ishii, N. Shimojo : *J. Health Sci.*, **47**, 571 (2001).
- 24) S. Yamaguchi, N. Kishikawa, K. Ohyama, Y. Ohba, M. Kohno, T. Masuda, A. Takadate, K. Nakashima, N. Kuroda : *Anal. Chim. Acta*, **665**, 74 (2010).
- 25) N. Kishikawa, N. Ohkubo, K. Ohyama, K. Nakashima, N. Kuroda : *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**, 1337 (2009).
- 26) N. Kishikawa, N. Ohkubo, K. Ohyama, K. Nakashima, N. Kuroda : *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 381 (2011).
- 27) S. Ahmed, S. Fujii, N. Kishikawa, Y. Ohba, K. Nakashima, N. Kuroda : *J. Chromatogr. A*, **1133**, 76 (2006).
- 28) S. Ahmed, N. Kishikawa, K. Nakashima, N. Kuroda : *Anal. Chim. Acta*, **591**, 148 (2007).
- 29) S. Ahmed, N. Kishikawa, K. Ohyama, M. Wada, K. Nakashima, N. Kuroda : *Talanta*, **78**, 94 (2009).
- 30) S. Ahmed, N. Kishikawa, K. Ohyama, T. Maki, H. Kurosaki, K. Nakashima, N. Kuroda : *J. Chromatogr. A*, **1216**, 3977 (2009).
- 31) S. Ahmed, N. Kishikawa, K. Ohyama, T. Imazato, Y. Ueki, N. Kuroda : *Talanta*, **85**, 230 (2011).
- 32) N. Kishikawa, M. Wada, Y. Ohba, K. Nakashima, N. Kuroda : *J. Chromatogr. A*, **1057**, 83 (2004).
- 33) N. Kishikawa, M. Nakao, Y. Ohba, K. Nakashima, N. Kuroda : *Chemosphere*, **64**, 834 (2006).
- 34) N. Kishikawa, M. Nakao, M. S. Elgawish, K. Ohyama, K. Nakashima, N. Kuroda : *Talanta*, **85**, 809 (2011).
- 35) N. Kishikawa, H. Nakashima, K. Ohyama, K. Nakashima, N. Kuroda : *Talanta*, **81**, 1852 (2010).

Development of Selective Detection Methods for Pharmaceutical and Biological Compounds Based on Fluorescence and Chemiluminescence Techniques and Its Application for Biomedical Analyses

Naoya KISHIKAWA¹

E-mail : kishika@nagasaki-u.ac.jp

¹ Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University, 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8521

(Received January 5, 2012 ; Accepted February 11, 2012)

In order to provide therapeutic advice or diagnosis, it is important to determine the concentration of a pharmaceutical agent or biomarker in biological fluids. However, it is difficult to determine a target analyte selectively due to interferences derived from a large number of co-existing biological components. In order to overcome this problem, we have developed selective detection methods for pharmaceutical agent or biomarker in the presence of biological components using a specific structure or characteristic of the target analyte. Among related studies, this review describes two principle methods : namely (1) selective fluorescence derivatization methods for aryl halide or terminal double bond based on palladium coupling reaction, and (2) selective detection methods for quinone by chemiluminescence and fluorescence reactions of utilizing the specific characteristics of quinone.

Keywords : fluorescence ; chemiluminescence ; high-performance liquid chromatography ; palladium coupling reaction ; quinone.