

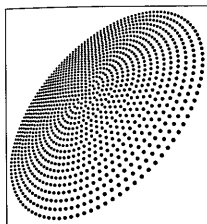
臨床化学

Vol.39 No.1 2010 別刷

特集

蛍光および化学発光法と 臨床分析化学

和田光弘, 中島憲一郎



蛍光および化学発光法と 臨床分析化学

和田光弘* 中島憲一郎*

1. はじめに

臨床化学に用いられる分析法は、高感度、高選択的であり、かつ操作性に優れることが要求される。高感度化の方策としては、1) ラベル化(誘導体化)による高感度化(モル吸光係数や蛍光量子収率の増加)、あるいはより高感度な検出法の適用〔蛍光(FL)や化学発光(CL)法等〕の他に、2) 酵素反応を利用した増幅反応の利用等がある。

次に選択性を向上させるには、1) より選択的な検出法の選択(例. 吸光度法<FL・CL法<<質量スペクトル法等)、2) 抗原抗体反応や酵素反応などの特異的な反応との組み合わせ、3) ラベル化による選択性の向上、および4) gas chromatography や high-performance liquid chromatography (HPLC) 等の分離分析法と組み合わせ等の方策がある。

さらに操作性を向上するには、装置の自動化が望まれ、これより簡便・迅速化さらには高精度化が達成できる。

上述のようにラベル化法は感度および選択性を向上させるのに有効な手法であり、これまで多くの研究者によって数多くのラベル化試薬が開発されている¹⁻³⁾。一方、臨床化学では分析

対象物およびその生体中での濃度に応じて多様な分析法が用いられる。中でも HPLC-FL 検出法や CL・生物発光法は非常に高感度な分析法であり、臨床検査項目においても、高感度性および高選択性が要求されるものに適用されている。特に CL は化学反応により蛍光性物質を励起し、そこから基底状態に戻る際に発光が生じる反応であり、光源を必要としない。そのため、光源由来のバックグラウンド発光の影響がなく、検出器の感度を高くして分析することが可能であり、FL を上回る高感度性を有するといわれている。

本稿では、分析法の感度および選択性の向上を目的として、著者らが開発した蛍光ラベル化試薬を用いた HPLC-FL 検出法、および CL 用試薬を用いた HPLC-過シュウ酸エステル化学発光(peroxyoxalate chemiluminescence: PO-CL)法について概説すると共に、医薬品を中心とする薬物あるいは生体微量成分等、臨床化学的な応用展開例を紹介して、蛍光および化学発光法と臨床分析化学の魅力的なつながりを解説する。

2. 発光分析用試薬の開発

2.1 蛍光ラベル化試薬の開発

ラベル化法は、分析対象物がラベル化反応に

* 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科

利用可能な官能基を有する場合に適用可能であり、分析法の選択性あるいは感度を向上させるのに有効な手段である。ここでは著者らがこれまでに開発した試薬の中で benzoxadiazole 誘導体および lophine 誘導体について紹介する。

2.1.1 Benzoxadiazole 誘導体

Benzoxadiazole 系 FL ラベル化試薬は、試薬自身が弱蛍光性あるいは無蛍光であり、ラベル化後の生成物が長波長側において強い FL を発するといったラベル化試薬として好ましい性質を有していることから、これまで多くの試薬が合成されている⁴⁾。著者らは 7-*N,N*-dimethylaminosulphonyl-4-(2,1,3-benzoxadiazolyl) isothiocyanate (DBD-NCS) や 7-aminosulphonyl-4-(2,1,3-benzoxadiazole)-isothiocyanate (ABD-NCS) といった Edman-type の FL ラベル化試薬を合成し、これらの試薬を D-および L-アミノ酸を含むペプチドのアミノ酸配列や立体配置の決定に応用することに成功している (図 1)^{5,6)}。図 1 はアミノ酸混液を分析した際のクロマトグラムを示している。ラベル化反応は 55°C、2 分と非常に迅速であり、Asp-, Ala-, Try-, Ile- および Phe-DBD ラベル化体を 30 分以内に分離定量が可能であった⁵⁾。この他、4-(*N,N*-dimethylaminosulphonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-H) および 4-aminosulphonyl-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole (ABD-H) はア

ルデヒドやケトン定量用の試薬であり⁷⁾、HPLC-FL 法を用いた場合、DBD ラベル化した C₆ ~ C₁₁ までの 4 種の鎖状アルデヒドを 86 ~ 152 fmol の範囲で検出可能であった⁸⁾。4-(*N,N*-dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F) はアミノ酸あるいは生体アミンのラベル化に有効である。本試薬は生体試料中の、脳の学習・記憶機能に関与する ACTH 類縁合成ペプチド ebitatide⁹⁾ やイソプロピル基を有する β-ブロッカー¹⁰⁾ の高感度定量に適用可能であった。また DBD 誘導体は PO-CL 法により非常に高感度に検出されることから^{11,12)}、PO-CL 検出用 FL ラベル化試薬として用いられる。

2.1.2 Lophine 誘導体

Lophine 誘導体は試薬自身の強い蛍光性あるいは化学発光性が知られており、本骨格はラベル化試薬としても有用であろうと考えられた。そこで著者らは様々な lophine 誘導体を合成し、その蛍光および化学発光特性を検討した (図 2)¹³⁾。この中で、R₁=COCl 基 [化合物 8, 4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)benzoyl chloride: DIB-Cl] および R₁=CONHNH₂ 基 [化合物 9, 2-(4-hydrazinocarbonylphenyl)-4,5-diphenylimidazole: HCPI] を導入した化合物が蛍光ラベル化試薬として有用であった。

HCPI は脂肪酸と縮合剤、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodi imide 存在下、室温で反応し、強蛍光性のラベル化体を生成す

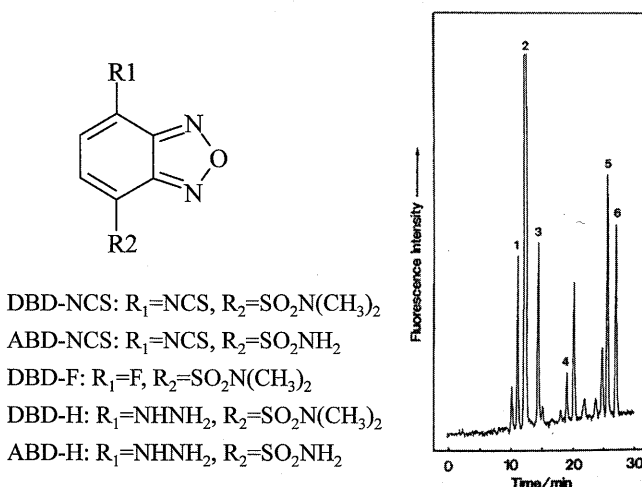
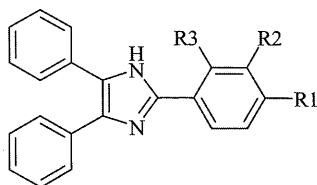


図 1 Benzoxadiazole 誘導体とアミノ酸分析への応用例
 データ：文献⁵⁾より引用



R₁; (R₂=R₃=H)

1: H (lophine)

2: CONHNHCO(CH₂)₄CH₃

3: CONHNHCO(CH₂)₁₀CH₃

4: CONHNHCO(CH₂)₁₄CH₃

5: CONHNHCO(CH₂)₁₆CH₃

6: CONHNHCO(CH₂)₁₈CH₃

7: COOH

8: COCl (=DIB-Cl)

9: CONHNH₂ (=HCPI)

10: COOCH₃

11: OCOCH₃

12: OCO(CH₂)₄CH₃

13: OCO(CH₂)₁₀CH₃

14: OCO(CH₂)₁₄CH₃

15: OH

16: R₁=OH, R₂=OCH₃

17: R₁=OCH₃, R₂=OCH₃, R₃=H

18: R₁=R₂=H, R₃=OH

図2 Lophine 誘導体

る。本試薬を用いる HPLC-FL 定量法では 6 種類の中・長鎖飽和脂肪酸 (C_{6,10,12,14,16,18,20}) を 7-56 fmol [シグナル/ノイズ比 (S/N) =3] の範囲で検出可能であった¹⁴⁾。

一方, DIB-Cl はアミノ化合物やフェノール化合物の有用な蛍光ラベル化試薬でもあり, これらの化合物と塩基性触媒の存在下,あるいはアルカリ条件下, 室温で反応し, 強蛍光性のラベル化体を生成する。著者らは本試薬を用いて OTC 医薬品の成分であるフェニルプロパノールアミン (PPA) の高感度定量法を開発し, 共存成分 (カフェイン, クロロフェニラミン) とのラット脳内の薬物動態学的相互作用の評価に

適用した。その結果, PPA とこれらの共存薬物の併用により PPA の脳微小透析液における AUC がカフェインで 1.6 倍 およびクロロフェニラミンで 1.8 倍上昇することを見出し, これらの併用が PPA による脳出血などの副作用発現に關与する可能性を示した¹⁵⁾。

この他, 著者らは外因性内分泌かく乱化学物質 (環境ホルモン) の 1 つとして知られるビスフェノール A を DIB-Cl を用いてラベル化し, その高感度 HPLC-FL 定量法を確立した。さらに本法をヒト血清や腹水¹⁶⁾ および母乳¹⁷⁾ に適用し, ビスフェノール A による汚染状況の評価を行った (図 3)。

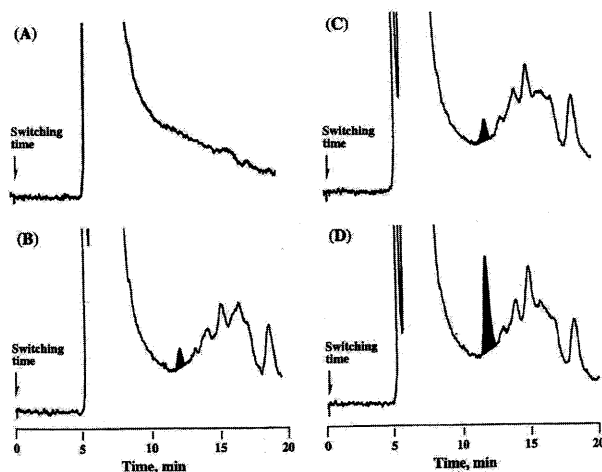


図3 Typical chromatograms corresponding to (A) reagent blank, (B) blood serum (BPA concentration: 0.81 ppb), (C) ascetic fluid (BPA concentration: 0.88 ppb) and (D) the ascetic fluid spiked with 3.0 ppb of BPA

データ: 文献¹⁶⁾より引用

2.2 化学発光試薬の開発

これまでルミノール化学発光など、多くの化学発光反応が見出され、臨床分析化学等に利用されてきている。この内、PO-CL 反応は、シュウ酸誘導体、過酸化水素および蛍光物質から成る発光反応であるが、その高感度性を利用して生体中の微量成分や医薬品あるいは環境汚染物質の定量などに適用されている¹⁸⁾。本反応機構は以下のように考えられている。まずシュウ酸誘導体が過酸化水素と反応し、エネルギー豊富な活性中間体を生成する。次いで、これが共存する蛍光物質と電荷移動錯体を形成し、エネルギー移動により蛍光物質を励起する。最後に励起された蛍光物質が基底状態に戻る際に発光を生じるといものである(図4)¹⁹⁾。生じる発光量はそれぞれの反応基質の量に比例することから、本発光反応を用いることで、シュウ酸誘導体、過酸化水素および蛍光物質が定量可能となる。また本発光反応ではシュウ酸誘導体および蛍光物質の選択が分析法の感度を大きく左右する。本節では、著者らが開発したシュウ酸誘導体並びに蛍光物質について紹介する。

2.2.1 Aryl oxalates

PO-CL に用いられる代表的なシュウ酸誘導体として bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate (TCPO) や bis(2,4-dinitrophenyl)oxalate (DNPO) などが知られているが、これらは HPLC のポストカラム化学発光試薬の溶媒としてしばしば用いられるアセトニトリルやアセトンへの溶解性が低いといった欠点を有する。そこで、この欠点を解決するために bis[2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl)-4-nitrophenyl]-oxalate (TDPO) を始め多くの試薬が開発された。著者らは TDPO と同様の利点を有する新規アリールシュウ酸誘導体を合成し、その化学発光特性を評価した(図4)²⁰⁾。その結果、既存の試薬類が、発光は強いが瞬間的な反応パターンを示すのに対して、反応開始後 40 分を超えても一定の発光強度を保つ試薬を合成することが出来た。これは写真法等に適用することでその有用性を最大限に発揮することが可能となる。

2.2.2 Pyrimido[5,4-d]pyrimidine 誘導体

抗血小板薬である 2,6-bis(diethanol amino)-4,8-dipiperidinopyrimido[5,4-d]pyrimidine (dipyridamole: DP) は PO-CL 系の蛍光物質

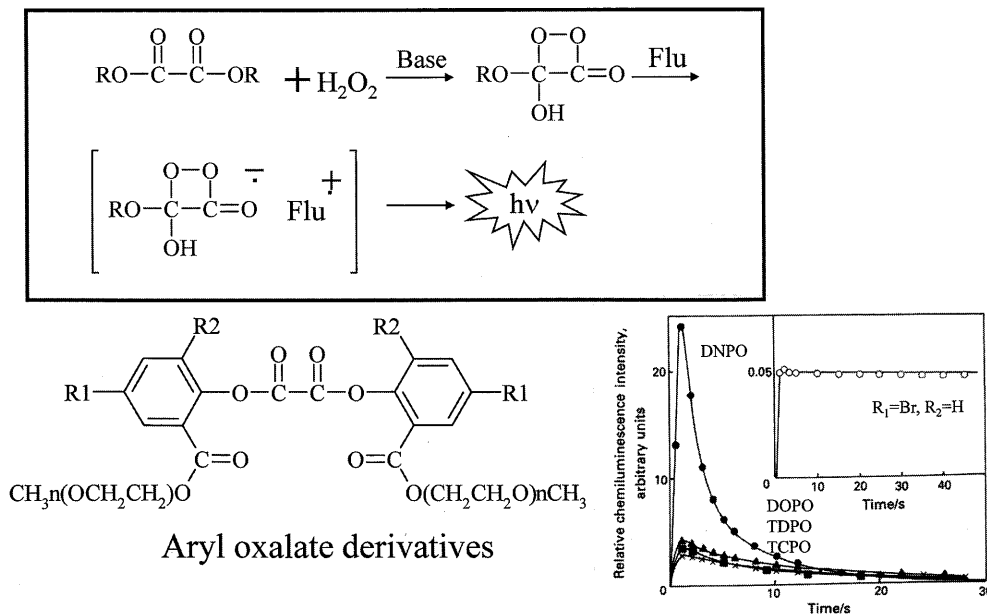


図4 過シュウ酸エステル化学発光反応および aryl oxalate 誘導体とその相対化学発光強度

として有用であった。そこで、著者らは、より有用な PO-CL 用蛍光試薬開発を目的として pyrimido [5,4-*d*] pyrimidine 誘導体を多数合成し、その化学発光特性を評価した (図 5)²¹⁾。その結果、2,4,6,8-tertathiomorpholinopyrimido[5,4-*d*]pyrimidine (化合物 1 (i) : TMP) が最も強い発光強度を与えた。すなわち代表的な蛍光物質である 9-aminoacridine (AA), 9,10-bis (phenylethynyl) anthracene (PEA), 9,10-diphenylanthracene (DPA) および rhodamine B (RB) と比較しても 10 倍以上強い発光を与えた。そこで TMP および TCPO を化学発光試薬として用いて、過酸化水素を定量した場合、その検出下限は 10 nM (S/N=3) と超高感度であった²²⁾。

3. 化学発光試薬の応用展開

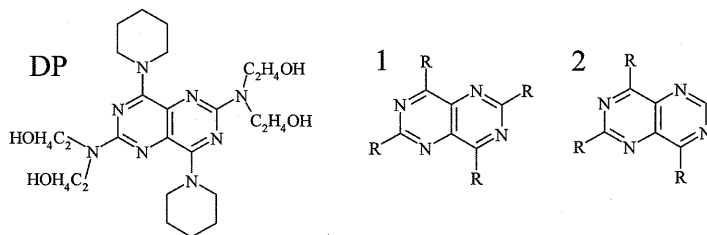
3.1 過酸化水素の高感度測定を利用した酵素基質の定量

PO-CL 検出により過酸化水素を高感度に検出できることは上述したが、これに過酸化水素生成を伴う酵素反応を組み合わせることで酵素基質の定量が可能となる。そこで著者らは、酵

素をアミノプロピル修飾したガラスビーズにグルタルアルデヒド法を用いて固定化し、これをステンレススチール製のミニカラムに充填した固定化酵素リアクター (immobilized enzyme reactor: IMER) を作成し、フローインジェクション分析法の流路に組み込み、オンラインで酵素反応を行うシステムを構築した。図 6 には D- アミノ酸定量システムの概略図を示している²³⁾。化学発光試薬には TCPO および TMP の混液を用いた。本法により 11 種類の D- アミノ酸を 0.4 ~ 30 pmol (S/N=3) の濃度範囲で検出可能であった。さらに本法を用いて健康人血漿中の総 D- アミノ酸濃度を測定したところ、その結果は従来の比色法により得られた結果と良好な相関を示した ($r=0.900$, $n=18$)。その他、コリン含有リン脂質²⁴⁾、モノアセチルポリアミンおよびポリアミン類²⁵⁾、およびグルコース²⁶⁾等、臨床検査項目として測定される化合物の測定系を確立した。

3.2 麻薬の超高感度分析法の開発とその応用

DBD 系蛍光ラベル化試薬を用いてラベル化後、PO-CL 検出することで、超高感度分析が可能となる。その具体例として毛髪中の乱用薬



Compound	R	RCI*	Compound	R	RCI*	Compound	R	RCI*
DP		100.0	1(h)	dihydroxyethylamino	57.4	2(c)	<i>m</i> -anisodino	<0.01
1(a)	anilino	16.5	1(i)	thiomorpholino	110.6	2(d)	morpholino	4.3
1(b)	<i>p</i> -anisodino	0.6	1(j)	diphenylamino	0.8	2(e)	pyrrolidino	26.3
1(c)	<i>m</i> -anisodino	9.6	1(k)	thiazolodino	70.1			
1(d)	morpholino	61.0	1(l)	benzylamino	18.0	AA		0.9
1(e)	pyrrolidino	37.4				PEA		4.6
1(f)	piperidino	33.4	2(a)	anilino	0.2	DPA		1.3
1(g)	hydroxyethylamino	7.1	2(b)	<i>p</i> -anisodino	<0.01	RB		4.4

*RCI: relative chemiluminescence intensity

図 5 Pyrimido[5,4-*d*]pyrimidine 誘導体と化学発光強度

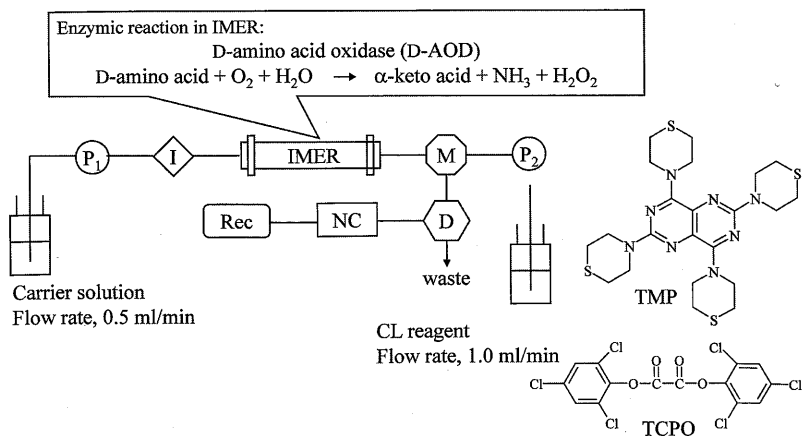


図6 固定化酵素を用いる D-アミノ酸の FIA-PO-CL 検出

P, pump; I, injector; IMER, immobilized enzyme reactor; M, mixing tee; D, detector; NC, noise cleaner; Rec, recorder.

FIA conditions: carrier solution, 20 mM imidazole-HNO₃ (pH 7.0); injection volume, 20 μl; IMER, 70 × 2 mm, i.d.; CL reagent, 0.25 mM TCPO/1.5 μM TMP in CH₃CN (=50:50, v/v)

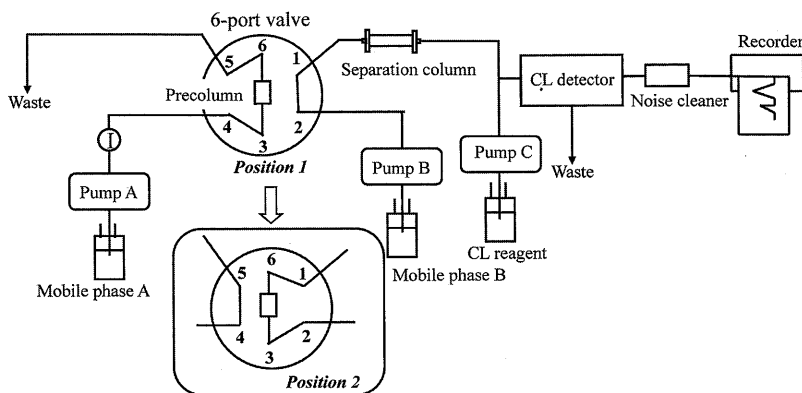


図7 カラムスイッチング法を用いる MDMA 関連化合物の HPLC-PO-CL 検出

HPLC conditions: separation column, Capcellpak C18 UG120 (250 × 1.5 mm, i.d.); precolumn, Develosil ODS UG-S (10 × 1.5 mm, i.d.); mobile phase A: 20 mM imidazole-HNO₃ buffer (pH 7.0)/CH₃CN (=65:35, v/v%); mobile phase B, 20 mM imidazole-HNO₃ buffer (pH 7.0)/CH₃CN/THF (=52:44:4, v/v/v%); CL reagent: 4 mM CPPO and 25 mM H₂O₂ in CH₃CN; injection volume: 5 μl

物を分析した例を紹介する。本邦で最も乱用される薬物であるメタンフェタミン (MP), あるいは近年その乱用が急増し, 問題となっている合成麻薬, 3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA) はアミノ基を有しており, これらは DBD-F を用いてラベル化が可能である。そこで, カラムスイッチング法を組み合わせた

HPLC-PO-CL システムを構築し (図7), 薬物乱用更正施設に入院中の患者から入手した毛髪に含まれるこれらの乱用薬物の定量に適用した (図8)¹²⁾。本法によりサブ ng/mg レベルの極微量薬物が定量可能であった。また入院時の面接のインタビューで患者が回答した使用薬物以外の薬物が毛髪から検出された。これらの結果

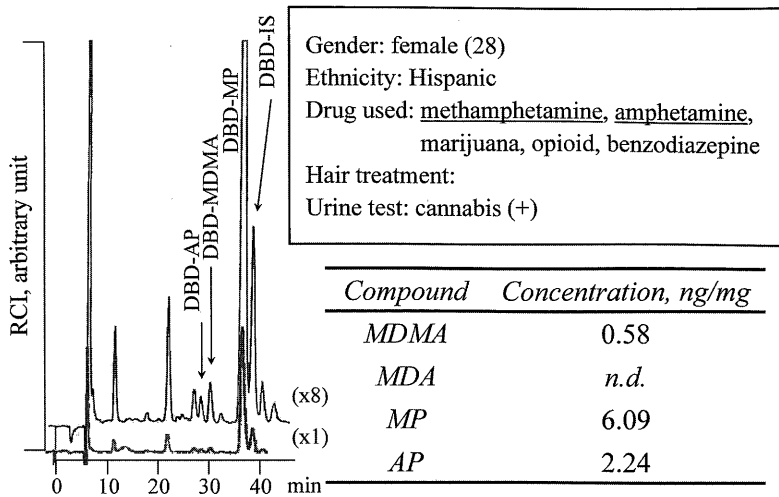


図8 薬物乱用更正施設入院患者の毛髪中 MDMA 類の分析
データ：文献¹²⁾より引用

から、乱用薬物使用歴のチェックに入院時に毛髪分析を行う有用性を示すことが出来た。今後は得られた毛髪分析の情報が治療方針の決定等に活用されることが期待できる。

さらに MDMA 錠剤中には MP あるいはカフェインなど他の乱用薬物が意図的に混入されたものも出回っている。そのため乱用者が予期せぬ健康被害を受けることが懸念されており、それら乱用薬物の相互作用の評価が急務である。そこで著者らはラベル化試薬に DIB-Cl を用い、HPLC-FL 法による MDMA の高感度分析法を開発し、これを MDMA とカフェインの併用による動態学的な相互作用の評価に適用した²⁷⁾。マイクロダイアリシス法を用い、ラットから採取した脳透析液中の MDMA を定量したところ、カフェインの併用により MDMA の T_{max} および mean residence time の延長が見られ、MDMA の効果の延長が考えられた。

4. おわりに

著者らは、FL ラベル化法と HPLC-FL あるいは HPLC-CL 検出法を組み合わせることで生体中の微量成分あるいは薬物の高感度かつ高選択的な分析法を開発し、これらを実試料分析に応用展

開した。優れた FL あるいは CL 分析試薬の開発と FL および CL 検出の高感度性が、新たな臨床化学分析法の開発につながり、ひいては新しい治療法に結びつく可能性が期待される。今後も FL および CL 等の発光分析と臨床化学分析の魅力的な結びつきが更に発展することを願っている。

■文献

- 1) Toyo'oka T: Fluorescent tagging of physiologically important carboxylic acids, including fatty acids, for their detection in liquid chromatography, *Anal Chim Acta*, **465**: 111-130, 2002.
- 2) Fukushima T, Usui N, Santa T, Imai K: Recent progress in derivatization methods for LC and CE analysis, *J Pharm Biomed Anal*, **30**: 1655-1687, 2003.
- 3) Yamaguchi M, Yoshida H, Nohta H: Luminol-type chemiluminescence derivatization reagents for liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J Chromatogr A*, **950**: 1-19, 2002.
- 4) 今井一洋：生命機能の分子認識と捕捉の高精密化に関する分析化学的研究，*薬学雑誌*，**123**: 901-917, 2003.
- 5) Imai K, Uzu S, Nakashima K, Akiyama S: Synthesis of novel fluorogenic edman reagents, 7-*N,N*-dimethylaminosulphonyl-4-(2,1,3-benzoxadiazoyl) isothiocyanate (DBD-CNS) and 7-aminosulphonyl-

- 4-(2,1,3-benzoxadiazolyl)isothiocyanate, *Biomed Chromatogr*, **7**: 56-57, 1993.
- 6) Imai K, Matsunaga H, Fukushima T, Santa T, Homma H, Nakashima K, Akiyama S: A novel method for the amino acid sequence/configuration determination of peptides containing D/L-amino acids utilizing a fluorogenic Edman reagent, 7-*N,N*-dimethylaminosulphonyl-4-(2,1,3-benzoxadiazolyl) isothiocyanate (DBD-NCS), *Biomed Chromatogr*, **9**: 152-154, 1995.
 - 7) Uzu S, Kanda S, Imai K, Nakashima K, Akiyama S: Fluorogenic reagents: 4-aminosulphonyl-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole and 4-hydrazino-7-nitro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole hydrazine for aldehydes and ketones, *Analyst*, **115**: 1477-1482, 1990.
 - 8) Nakashima K, Yoshida T, Kuroda N, Akiyama S: High-performance liquid chromatography of long chain aliphatic aldehydes with peroxyoxalate chemiluminescence detection utilizing a fluorogenic reagent, 4-(*N,N*-dimethylaminosulphonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole, *Biomed Chromatogr*, **10**: 99-101, 1996.
 - 9) Hamachi Y, Tsujiyama T, Nakashima K, Akiyama S: High-performance liquid chromatography with fluorescence detection of ebitatide using 4-(*N,N*-dimethylamino- sulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorogenic reagent, *Biomed Chromatogr*, **9**: 216-220, 1995.
 - 10) Uzu S, Imai K, Nakashima K, Akiyama S: Use of 4-(*N,N*-dimethylaminosulphonyl)- 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole as a labelling reagent for peroxyoxalate chemiluminescence detection and its application to the determination of the β -blocker metoprolol in serum by high-performance liquid chromatography, *Analyst*, **116**: 1353-1357, 1991.
 - 11) Uzu S, Imai K, Nakashima K, Akiyama S: 4-(*N,N*-dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole as chemilumigenic reagent for high performance liquid chromatographic peroxyoxalate chemiluminescence detection, *Biomed Chromatogr*, **5**: 184-185, 1991.
 - 12) Nakamura S, Wada M, Crabtree BL, Reeves PM, Montgomery JH, Byrd HJ, Harada S, Kuroda N, Nakashima K: A sensitive semi-micro column HPLC method with peroxyoxalate chemiluminescence detection and column switching for determination of MDMA-related compounds in hair, *Anal Bioanal Chem*, **387**: 1983-1990, 2007.
 - 13) Nakashima K, Yamasaki H, Kuroda N, Akiyama S: Evaluation of lophine derivatives as chemiluminogens by a flow-injection method, *Anal Chim Acta*, **303**: 103-108, 1995.
 - 14) Nakashima K, Taguchi Y, Kuroda N, Akiyama S: 2-(4-Hydrazinocarbonylphenyl)-4,5-diphenylimidazole as a versatile fluorescent derivatization reagent for the high-performance liquid chromatographic analysis of free fatty acids, *J Chromatogr*, **619**: 1-8, 1993.
 - 15) Kaddoumi A, Nakashima MN, Wada M, Nakashima K: Pharmacokinetic interactions between phenylpropanolamine, caffeine and chlorpheniramine in rats, *Eur J Pharm Sci*, **22**: 209-216, 2004.
 - 16) Kuroda N, Kinoshita Y, Sun Y, Wada M, Kishikawa N, Nakashima K, Makino T, Nakazawa H: Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascetic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent, *J Pharm Biomed Anal*, **30**: 1743-1749, 2003.
 - 17) Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K: Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection, *Biomed Chromatogr*, **18**: 501-507, 2004.
 - 18) Li F, Zhang C, Guo X, Feng W: Chemiluminescence detection in HPLC and CE for pharmaceutical and biomedical analysis, *Biomed Chromatogr*, **17**: 96-105, 2003.
 - 19) Rauhut MM, Sheehan D, Clarke RA, Semsel AM: Structural criteria for chemiluminescence in acyl peroxide decomposition reactions, *Photochem Photobiol*, **4**: 1097-1110, 1965.
 - 20) Nakashima K, Maki S, Akiyama S: Synthesis and evaluation of aryl oxalates as peroxyoxalate chemiluminescence reagents, *Analyst*, **114**: 1413-1416, 1989.
 - 21) Nakashima K, Akiyama S, Tsukamoto Y, Imai K: Synthesis of pyrimido[5,4-*d*]pyrimidine derivatives and their ultraviolet absorption and fluorescence spectral properties, *Dyes & Pigment*, **12**: 21-26, 1990.
 - 22) Nakashima K, Maki K, Akiyama S, Imai K: Evaluation of pyrimido[5,4-*d*]pyrimidine derivatives as peroxyoxalate chemiluminescence reagents using flow injection system, *Biomed Chromatogr*, **4**: 105-107, 1990.
 - 23) Wada M, Kuroda N, Akiyama S, Nakashima K: A sensitive and rapid FIA with an immobilized enzyme column reactor and peroxyoxalate chemiluminescence detection for the determination

- of total D-amino acids in human plasma, *Anal Sci*, **13**: 945-950, 1997.
- 24) Wada M, Nakashima K, Kuroda N, Akiyama S, Imai K: Sensitive flow-injection method with peroxyoxalate chemiluminescence detection combined with preparative high-performance liquid chromatography for determination of choline-containing phospholipids in human serum, *J Chromatogr B*, **678**: 129-136, 1996.
- 25) Wada M, Kuroda N, Ikenaga T, Akiyama S: Peroxyoxalate chemiluminescence determination of polyamines using on-line combination of high-performance liquid chromatography and an immobilized enzyme column reactor, *Ana Sci*, **12**: 807-810, 1996.
- 26) Nakashima K, Maki K, Kawaguchi S, Akiyama S, Tsukamoto Y, Imai K: Prooxyoxalate chemiluminescence assay of hydrogen peroxide and glucose using 2,4,6,8-tetrathiomorpholinopyrimido [5,4-*d*]pyrimidine as a fluorescent component, *Anal Sci*, **7**: 709-713, 1991.
- 27) Tomita M, Nakashima MN, Wada M, Nakashima K: Sensitive determination of MDMA and its metabolite MDA in rat blood and brain microdialysates by HPLC with fluorescence detection, *Biomed Chromatogr*, **21**: 1016-1022, 2007.

Desirable joint of fluorescence and chemiluminescence methods with clinical analytical chemistry

Mitsuhiro Wada*, Kenichiro Nakashima*

** Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University*