

キノンの選択的化学発光検出法とその臨床化学的応用

黒田直敬* 岸川直哉* 大山 要*

1. はじめに

化学発光分析法は励起源としての光源を必要としないことからバックグラウンドノイズが小さく、同じルミネセンス分析法に分類される蛍光分析法と比較しても、より高感度な分析が可能となる¹⁾。1877年に化学合成された有機化合物であるロフィンの最初の化学発光が報告されて以来、100年以上に渡って多くの研究者が新しい化学発光物質や化学発光系の探索・開発に取り組んできた。しかし、現在、臨床化学や分析化学の領域に応用されている化学発光系はそれほど多くはなく、ルミノール誘導体、アクリジニウムエステル誘導体、イミダゾピラジノン誘導体、アダマンタン誘導体による化学発光系や過シュウ酸エステル化学発光系などが利用されているのみである。このことは、実際の分析に適用できるような高い発光効率と安定性、取り扱いの容易さ等を兼ね備えた化学発光物質・化学発光系の開発が如何に容易ではないかを物語っている。このような背景を基に、筆者らは従来から使用されている発光系にも目を向け、発光に関与する活性酸素等の発生系と従来の化学発光系を組み合わせることで、様々な物質が分析可能になることを報告してきた^{2,4)}。

本稿では、そのような試みの一つとして、キノンの選択的な定量を可能とするキノンへの紫外線照射を利用する化学発光検出法、およびキノンの酸化還元サイクルを利用する化学発光検出法の開発とそれらの臨床化学的応用について紹介する。

生体にはコエンザイム Q10 やビタミン K などのキノン類が存在し、それぞれ電子伝達系や血液凝固、骨形成に関わるなど重要な役割を担っている。一方、キノンは医薬品、色素や農薬としても用いられるほか、大気粉じんやディーゼル排気微粒子中にも多環芳香族炭化水素のキノン体が見出されており、ヒト健康への影響が懸念される化合物でもある。従って、生体試料中や環境中に存在するキノンを選択的に検出できる高感度な分析法は、臨床化学、薬物動態学、毒性学、環境化学等の分野において非常に有用である。

2. 紫外線照射／過シュウ酸エステル化学発光に基づくキノンの定量

過シュウ酸エステル化学発光 (PO-CL) はシュウ酸エステル誘導体、過酸化水素、および蛍光物質の3者の反応で生じる化学発光であり (図1)、従来から過酸化水素あるいは蛍光物質の高感度定量に利用されてきた⁵⁾。一

*長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

方、筆者らはキノンに紫外線を照射すると過酸化水素と蛍光物質が同時に生成することを見出した⁶⁾。このように過シュウ酸エステル化学発光に必要な過酸化水素および蛍光物質を同時に与える物質は極めて珍しく、このキノンに特徴的な光化学反応現象を利用すれば生体試料中のキノンのみを選択的に検出することが可能になると考えられた(図2)。キノンの紫外線照射によって生じる蛍光物質は3,6-ジヒドロキシフタル酸(DHPA)であることを液体クロマトグラフィー/質量分析(LC-MS)、赤外吸収(IR)スペクトルおよび¹H-核磁気共鳴(NMR)スペクトル等の測定結果により明らか

にした。この蛍光物質は*o*-キノンや*p*-キノンのどちらからも共通して生成するので、様々なキノン化合物に適用することができる。そこで、図に示すような紫外線照射ユニットを組み込んだ高速液体クロマトグラフィー(HPLC)/化学発光検出装置を構築した(図3)。HPLCシステムは2台の送液ポンプ、インジェクター、ODSカラム、紫外線照射ユニット(低圧水銀ランプにPTFEチューブを巻きつけたものを自作)、化学発光検出器および記録計により構成される。ここでは、カラムでキノンを分離後、紫外線照射(254 nm, 15W)によってキノンを過酸化水素とDHPAに変換し、発光

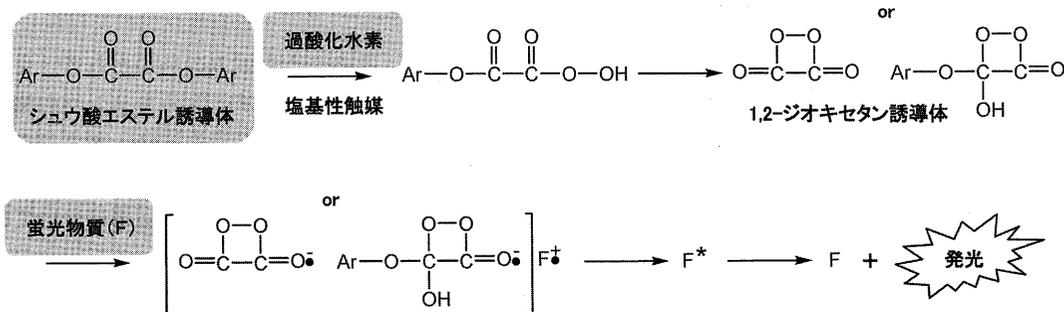


図1 過シュウ酸エステル化学発光反応

塩基性触媒存在下でシュウ酸エステル誘導体と過酸化水素から生じる高エネルギー中間体が蛍光物質との間に電荷移動錯体を形成し、エネルギーを受け取って励起した蛍光物質が基底状態に戻る際に発光が生じる。

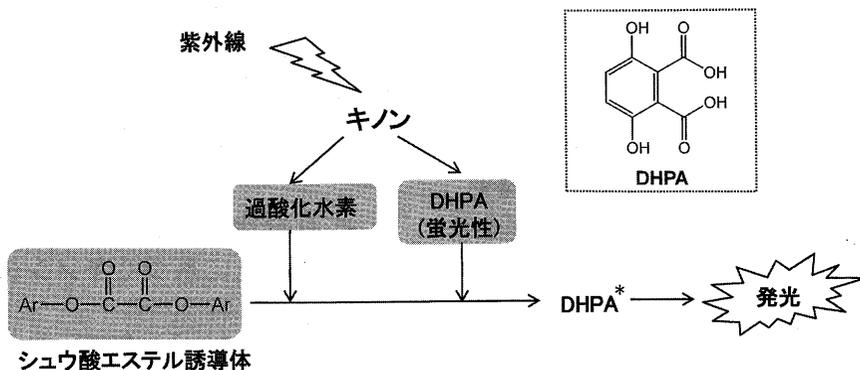


図2 紫外線照射/過シュウ酸エステル化学発光に基づくキノンの測定原理

キノンへの紫外線照射によって過酸化水素と蛍光物質 DHPA が同時に生成するため、シュウ酸エステルと混和するだけで発光が生じる。

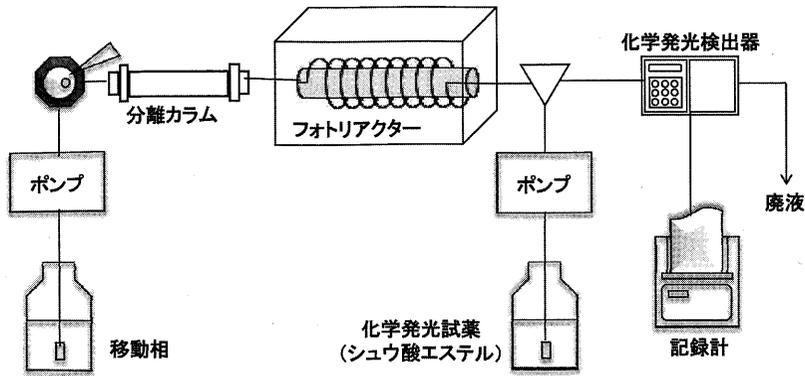


図3 キノンのHPLC-紫外線照射/過シュウ酸エステル化学発光定量装置

試薬であるシュウ酸エステル (TDPO: bis[2-(3,6,9-trioxadecanoyloxycarbonyl)-4-nitrophenyl]oxalate) と混和することで生じる発光を計測する。標準物質として典型的なキノンである1,2-ナフトキノン (1,2-NQ), 1,4-ナフトキノン (1,4-NQ), 9,10-フェナンスレンキノン (9,10-PQ), 9,10-アンスラキノン (9,10-AQ) の4種を用いて検量線を作成したところ、注入量当たり0.2~6.0 pmol (S/N=3) という検出下限を得ることができた⁶⁾。

次に、この装置をビタミンKの定量に適用した。ビタミンKはナフトキノン骨格を有し

ていることから、内標準 (I.S.) には2-methyl-3-pentadecyl-1,4-naphthoquinoneを新たに合成して使用した。HPLC分離条件、紫外線照射条件、および化学発光反応条件を最適化することで、ビタミンKの注入量当たりの検出下限 (S/N=3) はビタミンK₁であるフィロキノン (PK) で32 fmol、ビタミンK₂類であるメナキノン-4 (MK-4) で38 fmol、メナキノン-7 (MK-7) で85 fmolとなった⁷⁾。この方法によって、ヒト健常人血漿1 ml中のビタミンKを良好に定量することができた (図4)。

ドキソルピシンやダウノルピシンはアンスラ

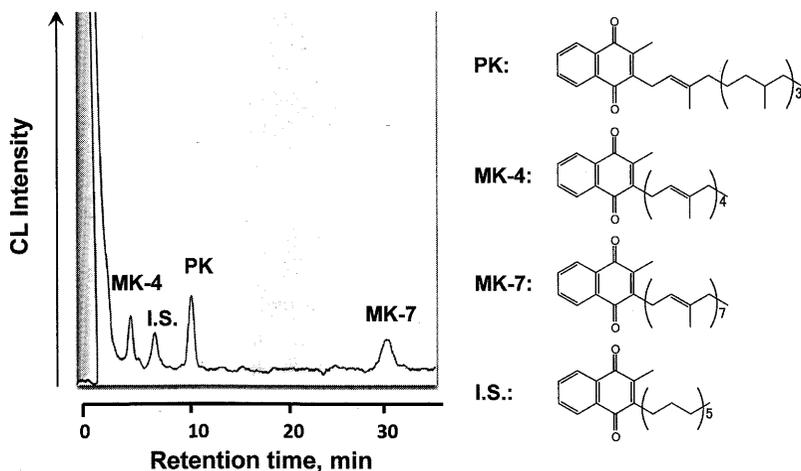


図4 ヒト血漿中のビタミンKのクロマトグラム

HPLC装置: 移動相, 600 mM imidazole-HNO₃ buffer (pH 9.0)/CH₃CN (5:95,v/v), 流速 0.25 ml/min; カラム, Develosil ODS UG-5 (50 mm × 1.5 mm i.d.); 発光試薬, 0.6 mM TDPO/CH₃CN, 流速 0.80 ml/min; 低圧水銀ランプ, 15 W, 254 nm; 反応コイル, 6.0 m × 0.5 mm i.d. 試料: ヒト血漿, 1.0 ml

サイクリン系の抗腫瘍薬として臨床的に用いられているが、その構造中にキノン骨格を有している。そこで、ドキソルビシン (DXR) およびその代謝物ドキソルビシノール (DXR-ol) の紫外線照射/過シユウ酸エステル化学発光定量法の開発を試みた⁸⁾。DXR および DXR-ol は蛍光性を有しており、それら自身も PO-CL 反応におけるエネルギー受容体となるが、エタノール等の水素供与体存在下では光増感剤としても働き、溶存酸素を過酸化水素へと変換する。従って、エタノールを含む移動相によって DXR および DXR-ol を分離し、紫外線照射後にシユウ酸エステルと混合することでより効果的な発光が生じる。この発光を利用する定量法はメタノールによる除タンパクのみという簡便な前処理操作でラット血漿 50 μ l 中の DXR および DXR-ol を定量可能であった。DXR および DXR-ol の検出下限 (S/N=3) はそれぞれ注入量当たり 4.5 および 3.8 fmol と非常に高感度であり、DXR 投与後のラット血漿中の DXR および DXR-ol の濃度モニタリングが十分に可能であった (図 5)。

3. 紫外線照射/ルミノール化学発光に基づくキノンの定量

キノンに紫外線照射を行うことにより活性酸素種と DHPA が同時に生成することは前述したが、興味深いことに、DHPA がルミノール化学発光反応に関しても効果的な増強剤として働くことを新たに見出した⁹⁾。また、キノンへの紫外線照射により複数の活性酸素種が発生するが、種々の活性酸素消去剤を用いた検討により、スーパーオキシドアニオンがルミノール化学発光に強く関係することが明らかとなった。さらに、電子スピン共鳴 (ERS) スペクトル等の測定結果より、DHPA はアルカリ溶液中で安定なセミキノンラジカルを形成し、これがルミノールをルミノールラジカルへと変換することで発光を増強させる機構が推測された。本原理に基づいて、まず、4 種類のキノン (1,2-NQ, 1,4-NQ, 9,10-PQ および 9,10-AQ) を対象に HPLC 定量を行った。ここでは、発光試薬としてルミノールよりも強い発光強度を与えたルミノール誘導体 L-012 (8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4-

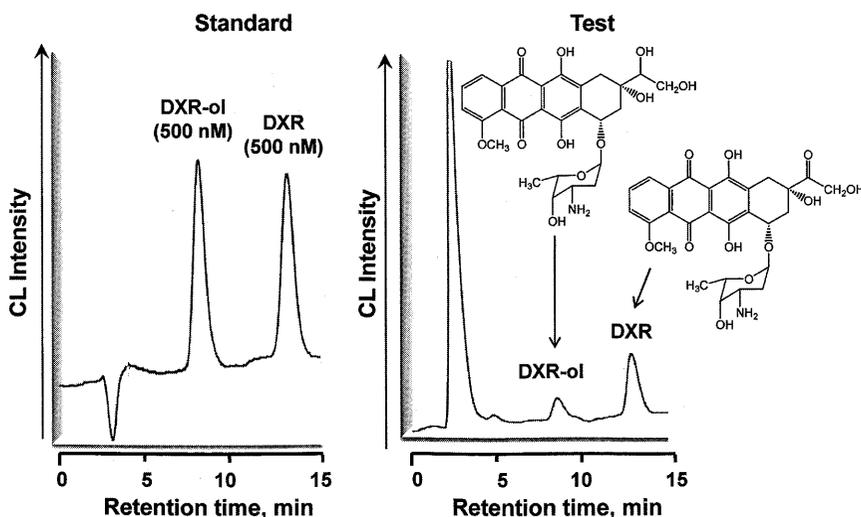


図 5 ラット血漿中の DXR および DXR-ol のクロマトグラム

HPLC 装置：移動相、20 mM SDS を含む 50 mM imidazole-TFA buffer (pH 6.8)/CH₃CN / C₂H₅OH (55:35:10,v/v/v)、流速 0.3 ml/min；カラム、Cosmosil 5C18-AR-II (150 mm × 2.0 mm i.d.)；発光試薬、0.5 mM TDPO/CH₃CN、流速 0.7 ml/min；低圧水銀ランプ、15 W, 254 nm；反応コイル、2.0 m × 0.25 mm i.d.

試料：5 mg/kg DXR を単回投与 60 分後に採取したラット血漿、50 μ l

(2*H*,3*H*)dione) を用いた。本法の検出下限 (S/N=3) は注入量当たり 1.5 ~ 24 fmol であり、従来報告されているキノンの定量法と比較して 10 ~ 1000 倍高感度であった。そこで、本法を長崎市街地で捕集した大気粉じん試料に適用したところ、上記キノンの4種類全てが検出され、これらを良好に定量することができた (図6)。ここで開発した方法もキノンに対して選択的であることから、今後、この化学発光系についても臨床化学的な応用展開を図っていく予定である。

4. キノンの酸化還元サイクルを利用する化学発光定量

キノンは生体内において内在性の還元物質により不安定なセミキノンラジカルへと還元され、これが溶存酸素により酸化される際に活性酸素が生成する。このセミキノンラジカル自身は再び元のキノンへと酸化されることでキノンの酸化還元サイクルが成り立っている。そこで、キノンの酸化還元サイクルに伴って発生する活性酸素をルミノール化学発光で検出するという原理に基づくキノンの選択的定量法を考案した (図7)¹⁰。測定条件を最適化した結果、還元

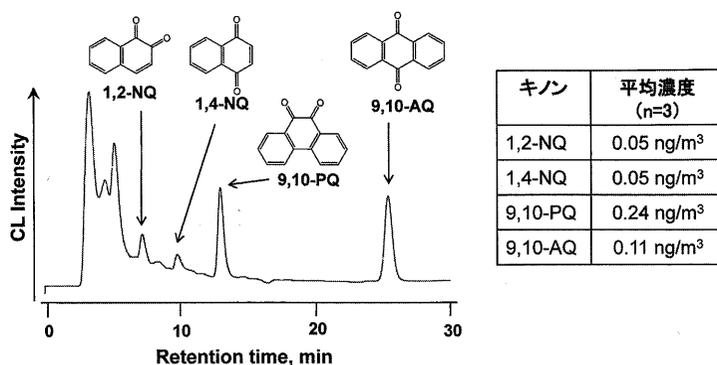


図6 大気粉じん試料のクロマトグラムと長崎市街地におけるキノンの濃度
HPLC 装置：移動相, 100 mM imidazole-TFA buffer (pH 9.0)/CH₃CN (50:50,v/v), 流速 0.75 ml/min; カラム, Discovery HS C18 (250 mm × 4.6 mm i.d.); 発光試薬, 3 μM L-012/0.1 M NaOHaq., 流速 0.80 ml/min; 低圧水銀ランプ, 16 W, 254 nm; 反応コイル, 5.0 m × 0.25 mm i.d.
試料: Q-R100 silica filter にて採取した (流速 1200 l/min, 24 h) 大気粉じん試料, silica filter, 1 cm × 1 cm

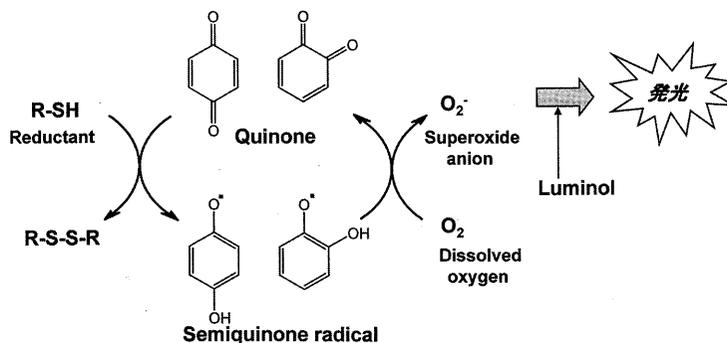


図7 キノンの酸化還元サイクルを利用する化学発光測定原理

剤としてはジチオスレイトール (DTT) が最適であり、これとキノンを組み合わせることで、キノン濃度に依存した発光量が得られた。生体に存在するピロロキノリンキノン、フィロキノン、およびコエンザイム Q10 のいずれも本反応系で比較的寿命の長い発光を示した。一例としてコエンザイム Q10 の発光パターンを図 8 に示す。

本反応に関与する活性酸素は、種々の活性酸素消去剤を用いた検討によりスーパーオキシドアニオンであることが明らかになった。本発光系もキノンと還元剤が共存するときのみ観測される特異的な現象であることから、キノンの選択的検出への展開が期待できる。バッチ法を用いて製剤中コエンザイム Q10 の含量を求めたところ、試料をエタノールに溶解後適当に希釈し、ルミノールとジチオスレイトールを添加するという簡単な分析操作によって、1 検体を 30 秒以内に迅速に分析することができた。ヒト血漿中のコエンザイム Q10 濃度は甲状腺機能亢進症やメバロン酸尿症等で低下することが報告されていることから臨床化学的にも興味ある対象である。今後、本発光系と HPLC とを組み合わせることでコエンザイム Q10 を始めとする生体キノンの定量法を開発する予定である。

5. おわりに

キノンは生体においてはビタミンや補酵素として存在し、また、医薬品、色素、農薬あるいは環境汚染物質として体内に取り込まれることが想定される物質でもある。さらに最近では、エストロゲン、合成エストロゲン製剤や環境中の多環芳香族炭化水素等が体内で代謝される過程でキノンを生じ、これが DNA 等と反応することで発がんを引き起こす可能性も指摘されている¹¹⁻¹³⁾。このようにキノンは臨床化学および毒性学的な観点から非常に興味深い物質であり、今後とも、生体に存在するキノンの特定、測定意義の精査や分析法開発に関する研究が更に進展することを期待する。

■文献

- 1) García-Campaña A M, Román-Ceba M: Historical evolution of chemiluminescence, eds García-Campaña A M, Baeyens W R G, p. 2-39, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001.
- 2) Amponsaa-Karikari A, Kishikawa N, Ohba Y, Nakashima K, Kuroda N: Determination of artemisinin in human serum by high-performance liquid chromatography with on-line UV irradiation and peroxyoxalate chemiluminescence detection, *Biomed Chromatogr*, **20**: 1157-1162, 2006.
- 3) Ihara A, Kishikawa N, Wada M, Ohba Y, Nakashima K, Kuroda N: Determination of aromatic compounds by high-performance liquid

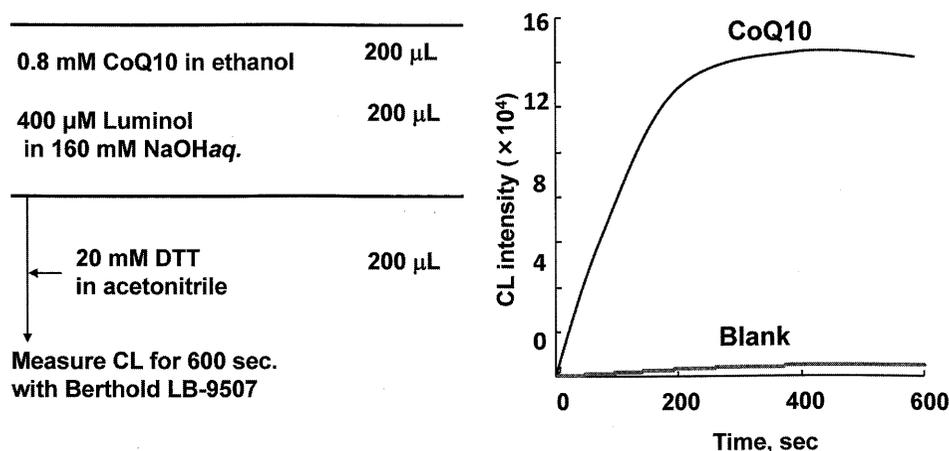


図8 コエンザイム Q 10 の測定操作と化学発光パターン

- chromatography with on-line photoreactor and peroxyoxalate chemiluminescence detection, *Luminescence*, **22**: 567-574, 2007.
- 4) Kodamatani H, Yamazaki S, Saito K, Amponsaa-Karikari A, Kishikawa N, Kuroda N, Tomiyasu T, Komatsu Y: Highly sensitive method for determination of *N*-nitrosoamines using high-performance liquid chromatography with online UV irradiation, luminol chemiluminescence detection, *J Chromatogr A*, **1216**: 92-98, 2009.
 - 5) Kuroda N, Kai M, Nakashima K: Chemiluminescence detection in liquid chromatography, eds García-Campaña A M, Baeyens W R G, p. 393-425, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001.
 - 6) Ahmed S, Fujii S, Kishikawa N, Ohba Y, Nakashima K, Kuroda N: Selective determination of quinones by high-performance liquid chromatography with on-line post column ultraviolet irradiation and peroxyoxalate chemiluminescence detection, *J Chromatogr A*, **1133**: 76-82, 2006.
 - 7) Ahmed S, Kishikawa N, Nakashima K, Kuroda N: Determination of vitamin K homologues by high-performance liquid chromatography with on-line photoreactor and peroxyoxalate chemiluminescence detection, *Anal Chim Acta*, **591**: 148-154, 2007.
 - 8) Ahmed S, Kishikawa N, Ohyama K, Wada M, Nakashima K, Kuroda N: Selective determination of doxorubicin and doxorubicinol in rat plasma by HPLC with photosensitization reaction followed by chemiluminescence detection, *Talanta*, **78**: 94-100, 2009.
 - 9) Ahmed S, Kishikawa N, Ohyama K, Maki T, Kurosaki H, Nakashima K, Kuroda N: An ultrasensitive and highly selective determination method for quinones by HPLC with photochemically initiated luminol chemiluminescence, *J Chromatogr A*, **1216**: 3977-3984, 2009.
 - 10) Kishikawa N, Ohkubo N, Ohyama K, Nakashima K, Kuroda N: Chemiluminescence assay for quinones based on generation of reactive oxygen species through the redox cycle of quinone, *Anal Bioanal Chem*, **393**: 1337-1343, 2009.
 - 11) Bolton J L, Thatcher G R J: Potential mechanisms of estrogen quinone carcinogenesis, *Chem Res Toxicol*, **21**: 93-101, 2008.
 - 12) Saeed M, Rogan E, Cavalieri E: Mechanism of metabolic activation and DNA adduct formation by the human carcinogen diethylstilbestrol: The defining link to natural estrogens, *Int J Cancer*, **124**: 1276-1284, 2009.
 - 13) Flowers L, Ohnishi S T, Penning T M: DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon *o*-quinones: role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redox cycling, and *o*-semiquinone anion radicals, *Biochemistry*, **36**: 8640-8648, 1997.

Selective determination of quinones with chemiluminescence detection and its application to clinical chemistry

Naotaka Kuroda*, Naoya Kishikawa*, Kaname Ohyama*

* *Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University*