

博士論文

キノンの酸化還元サイクルを利用する  
新規キノン定量法の開発

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科  
生命薬科学専攻 薬品分析化学研究室

福田 瑞穂

2020 年



## 目次

|  |    |
|--|----|
| 【緒言】 .....                             | 1  |
| 【第一章】 ヒト血漿中 PQQ の HPLC-CL 定量法の開発 ..... | 7  |
| 1-1. HPLC-CL システムの構築 .....             | 12 |
| 1-2. PQQ 標準溶液のクロマトグラム .....            | 14 |
| 1-3. 測定条件の最適化 .....                    | 15 |
| 1-3-1. 反応コイル .....                     | 15 |
| 1-3-2. ルミノール濃度 .....                   | 16 |
| 1-3-3. 水酸化ナトリウム濃度 .....                | 17 |
| 1-3-4. DTT 濃度 .....                    | 18 |
| 1-4. 検量線及び検出下限 .....                   | 19 |
| 1-5. 血漿試料の前処理操作 .....                  | 20 |
| 1-6. ヒト血漿中 PQQ のクロマトグラム .....          | 23 |
| 1-7. 添加検量線及び検出下限 .....                 | 24 |
| 1-8. 回収率と日内及び日間の再現性 .....              | 26 |
| 1-9. 血漿中における PQQ の安定性 .....            | 27 |
| 1-10. ヒト血漿中 PQQ 濃度の変動 .....            | 28 |
| 1-10-1. 実験概要 .....                     | 28 |
| 1-10-2. サプリメント服用血漿のクロマトグラム .....       | 29 |
| 1-10-3. サプリメント服用による血漿中 PQQ 濃度の変化 ..... | 30 |
| 1-11. 小括 .....                         | 32 |
| 【第二章】 UQ の発色定量法の開発 .....               | 33 |
| 2-1. 発色反応の確認 .....                     | 37 |
| 2-2. 測定操作 .....                        | 39 |
| 2-3. 測定条件の最適化 .....                    | 40 |

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| 2-3-1. 反応時間 .....                | 40        |
| 2-3-2. INT 濃度.....               | 41        |
| 2-3-3. NaBH <sub>4</sub> 濃度..... | 42        |
| 2-3-4. 水酸化ナトリウム濃度 .....          | 43        |
| 2-4. 検量線及び検出下限 .....             | 44        |
| 2-5. 日内及び日間の再現性 .....            | 47        |
| 2-6. 実試料への応用 .....               | 48        |
| 2-6-1. 添加剤の影響 .....              | 48        |
| 2-6-2. 化粧品中 UQ の定量 .....         | 49        |
| 2-7. 他のキノンへの応用性 .....            | 50        |
| 2-8. 小括 .....                    | 51        |
| <br>                             |           |
| <b>【総括】</b> .....                | <b>52</b> |
| <br>                             |           |
| <b>【実験の部】</b> .....              | <b>54</b> |
| <br>                             |           |
| <b>【謝辞】</b> .....                | <b>58</b> |
| <br>                             |           |
| <b>【参考文献】</b> .....              | <b>59</b> |

## 略語表

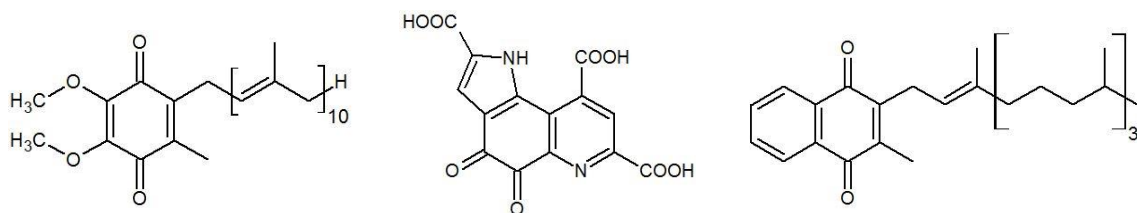
- $^1\text{H}$  NMR: proton nuclear magnetic resonance
- 1,2-NQ: 1,2-naphthoquinone
- 1,4-NQ: 1,4-naphthoquinone
- 9,10-PQ: 9,10-phenanthrenequinone
- ATP: adenosine triphosphate
- CE: capillary electrophoresis
- CL: chemiluminescence
- CZE: capillary zone electrophoresis
- DHPA: 3,6-dihydroxyphthalic acid
- DTT: dithiothreitol
- ECD: electro chemical detector
- FDA: food and drug administration
- GC: gas chromatography
- HbA1c: hemoglobin A1c
- HPLC: high performance liquid chromatography
- i.d.: internal diameter
- INT: iodonitrotetrazolium chloride
- LOD: limit of detection
- LOQ: limit of quantitation
- MS/MS: tandem mass spectrometry
- NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
- PO: peroxyoxalate
- PQQ: pyrroloquinoline quinone

- ROS: reactive oxygen species
- RSD: relative standard deviation
- S/B ratio: signal to blank ratio
- SD: standard deviation
- SEM: standard error of mean
- S/N ratio: signal to noise ratio
- SPE: solid phase extraction
- TBAB: tetrabutylammonium bromide
- UQ: ubiquinone
- UV: ultraviolet
- VK<sub>1</sub>: phylloquinone
- VK<sub>2</sub>: menaquinone

## 【緒言】

キノンは生体内や環境中といった我々の身の回りに幅広く存在する化合物である。例えば、生命活動において重要な役割を担っているキノンの例として、ミトコンドリア内膜の電子伝達系において ATP の産生に関与するユビキノン (UQ)<sup>1,2)</sup>や、酸化還元酵素の補酵素として働くピロロキノリンキノン (PQQ)<sup>3)</sup> が挙げられる。また、ナフトキノン誘導体であるビタミン K は血液凝固等に関わるタンパク質の  $\gamma$ -カルボキシル化を行なう  $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼの補酵素として機能している<sup>4,5)</sup>。一方で、抗悪性腫瘍薬のドキソルビシン<sup>6)</sup>やニューモシスチス肺炎治療薬のアトバコン<sup>7)</sup>といったキノン構造を有する医薬品も存在している。このほか、セイヨウアカネの根から得られるキノンであるアリザリンは染料として用いられており<sup>8)</sup>、ジチアノンは構造中にニトリル基を有し、酵素と不可逆的に反応することで殺菌作用を示すことから農薬として用いられている<sup>9)</sup>。このように、生理機能や産業上の用途等で有用な働きを示すキノンが存在する一方で、生体障害作用を有するキノンも知られている。例えば、大気粉じんやディーゼル排気微粒子中に含まれる 9,10-フェナンスレンキノン (9,10-PQ) 等の多環芳香族炭化水素キノンは、肺がんや喘息等の呼吸器疾患への関与が報告されている<sup>10-12)</sup>。また、エストロゲンやドパミンが生体内で酸化されて生じるエストロゲンキノンやドパミンキノンは、それぞれ乳がん<sup>13,14)</sup>やパーキンソン病<sup>15,16)</sup>に関与しているとされている。さらに、キノンはグルタチオンや NADPH といった生体内還元物質との反応を介して活性酸素を発生し、細胞に酸化ストレスを与えるほか、ペプチドやタンパク質との反応により、これらの機能を障害する恐れもある<sup>17,18)</sup> (Figure 1)。

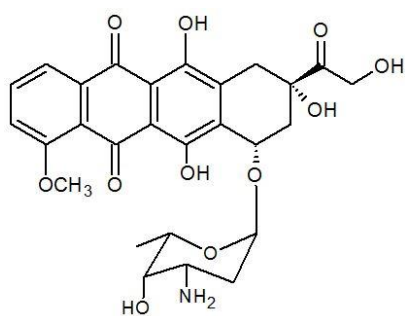
このような背景から、生体試料や環境試料中に含まれるキノンの正確な定量法が必要とされている。筆者の所属する研究室では、これまでに多様な検出原理に基づくキノンの高感度かつ選択的な定量法を数多く報告してきた。例えば、蛍光検出法として自動車等の排気ガスに含まれる 9,10-PQ を対象としたプレカラム発蛍光誘導体化 HPLC 定量法が開発されている<sup>19)</sup>。9,10-PQ をはじめとするキノン類は蛍光性が弱いため、蛍光検出による高感度定量は困難であった。そこで、9,10-PQ をベンズアルデヒド及び酢酸アンモニウムと反応させ、強蛍光性イミダゾール誘導体へと変換してから蛍光検出を行なった。誘導体化反応に使用する



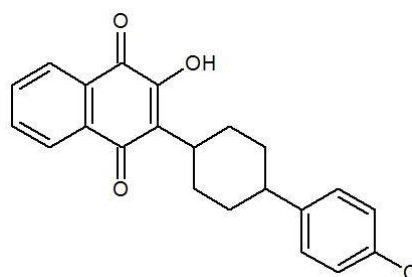
**Ubiquinone  
(UQ)**

**Pyrroloquinoline quinone  
(PQQ)**

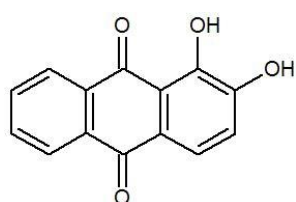
**Phylloquinone  
(vitamin K1)**



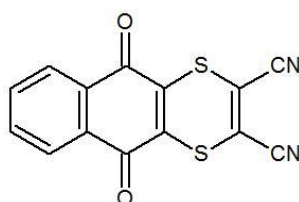
**Doxorubicin**



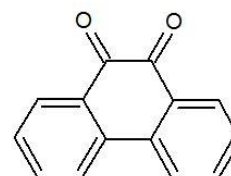
**Atovaquone**



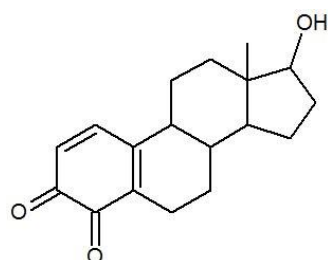
**Alizarin**



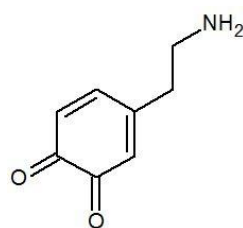
**Dithianon**



**9,10-Phenanthrenequinone  
(9,10-PQ)**



**Estrogen quinone**



**Dopamine quinone**

**Figure 1 Structures of major quinone compounds.**

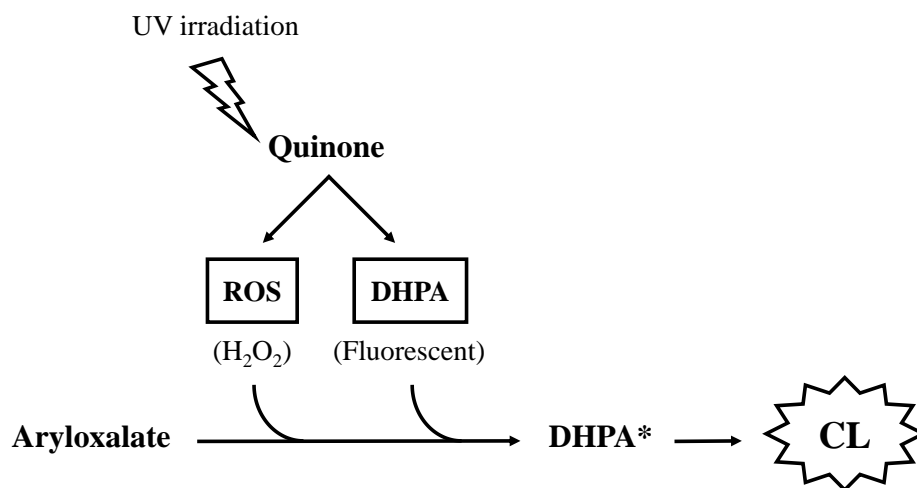


ベンズアルデヒド及び酢酸アンモニウムは、ともに無蛍光性であるため、試薬による検出の妨害を受けることなく高感度に9,10-PQの定量が可能となった。さらに、開発した方法を市街地における9,10-PQの大気内動態解析へと応用し、その季節変動や他の大気汚染物質との関連性を明らかにしている<sup>20)</sup>。

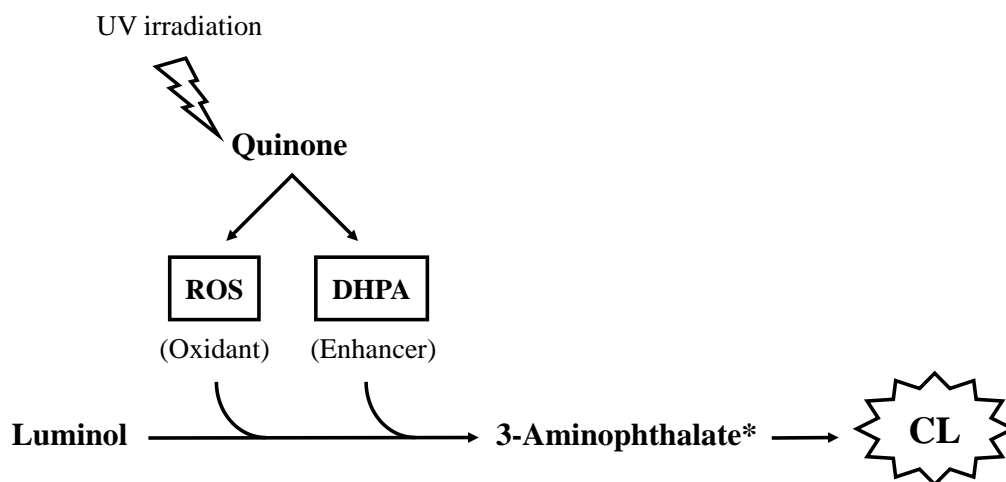
一方、高感度な化学発光 (CL) 法に基づくキノンの分析法として、過シュウ酸エステル (PO)-CL を利用する CL 検出法も開発されている。PO-CL ではシュウ酸エステルと過酸化水素との反応によって生じる活性中間体が、共存する蛍光物質と電荷移動錯体を形成し、エネルギーを受け渡す。蛍光物質は受け取ったエネルギーにより励起され、これが基底状態へ戻る際に放出される発光が検出される。通常、PO-CL はシュウ酸誘導体、過酸化水素及び蛍光物質の共存下で起こるが、キノンに紫外線 (UV) を照射すると、蛍光物質である 3,6-dihydroxyphthalic acid (DHPA) と過酸化水素をはじめとする活性酸素種が同時に発生することが見出された<sup>21)</sup>(Figure 2(a))。DHPA は *o*-キノン及び *p*-キノンのどちらからも発生したことから、様々なキノンの検出に応用可能であると考えられた。そこで、キノンにオンラインで UV 照射を行なった後に、シュウ酸エステルのみからなる CL 試薬と混合する HPLC-PO-CL システムを新たに構築し、ナフトキノンの典型的なキノンを用いて検討を行なった。その結果、キノンへの UV 照射により発生する DHPA 及び過酸化水素と、シュウ酸エステルとの反応で生じる CL を測定することでキノンの定量が可能であることが確認された。さらに、開発した方法の生体分析への応用として、健康人血漿中のビタミン K 濃度<sup>22)</sup>やラット血漿中のドキシソルビシン濃度<sup>23)</sup>を定量した例が報告されている。

また、DHPA は PO-CL 系における蛍光物質としてだけでなく、ルミノール CL 系においては発光の増強剤として働くことが見出され (Fig. 2(b))、この現象を利用する、キノンの HPLC-ルミノール CL 定量法が開発された<sup>24)</sup>。種々のルミノール誘導体の中で、最も強い発光強度を与えた 8-Amino-5-chloro-2,3-dihydro-7-p henyl-pyrido[3,4-d]pyridazine-1,4-dion (L-012) を選択し、大気粉じん中に含まれる 1,2-ナフトキノンの (1,2-NQ)、1,4-ナフトキノンの (1,4-NQ)、9,10-PQ 及び 9,10-アントラキノンの (9,10-AQ) の定量へと応用された。この方法は、ルミノール CL 法に通常必要とされる酸化剤や触媒等を用いないことから、バックグラウンドノイズの大幅な低減により、PO-CL 法<sup>21)</sup>と比較して 60–270 倍高感度な測定が可能となった。

**(a) PO-CL reaction**

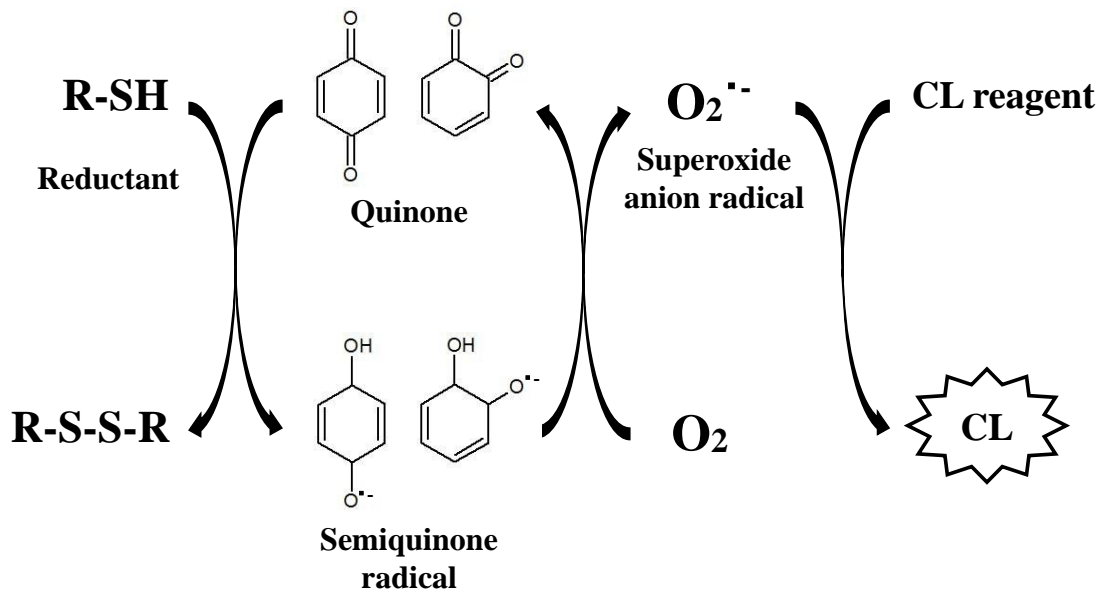


**(b) Luminol CL reaction**



**Figure 2** Generation of DHPA and ROS from quinone by UV irradiation. The CL reaction of DHPA and ROS in (a) PO-CL reaction and (b) luminol CL reaction.

2009年には、新たなキノンの測定原理として、キノンの酸化還元サイクルを利用する CL 検出法が報告された<sup>25)</sup>。キノンは生体内において、NADH デヒドロゲナーゼ等の還元物質によって不安定なセミキノンラジカルに還元された後、元のキノンへと再酸化される過程で溶存酸素を活性酸素へと変換する性質を有する。このとき発生する活性酸素量はキノンの濃度に比例するため、ルミノール等の CL 試薬を用いた活性酸素の検出により、間接的にキノンの定量が可能となる (Figure 3)。この方法は、キノン溶液に還元剤及び CL 試薬を混合するという簡便な操作で、UQ や PQQ, ビタミン K といった生理学的に重要なキノンの CL 検出が可能であった。実際にこの CL 法は、製剤中 UQ の定量へと応用されている。さらに、本原理を組み込んだ HPLC システムの構築により、ヒト血漿中 UQ の定量<sup>26)</sup>や、ビタミン K の一種であるメナジオンとその代謝物のラット血中濃度の測定<sup>27)</sup>等に応用した例が報告されている。



**Figure 3** Mechanism of CL detection for quinone based on quinone redox cycle.

本研究では、これまでに開発されてきたキノン定量法の応用範囲をさらに拡大する目的で、PQQ や UQ を対象として、これらのキノンの酸化還元サイクルに基づく新規定量法の開発を試みた。

第一章では、キノンの酸化還元サイクルを利用するルミノール CL 法の新たな応用として、PQQ の HPLC-CL 定量法の開発と血中濃度モニタリングへの適用を検討した。PQQ と還元剤との反応によって発生するスーパーオキシドアニオンラジカルを、CL 試薬であるルミノールを用いて検出することで、PQQ の高感度かつ選択的な定量が可能となった。さらに、新たに開発した PQQ の固相抽出法との組み合わせにより、ヒト血漿中に含まれる微量 PQQ の定量が可能となった。最終的に、PQQ サプリメントを服用した健常人ボランティアから経時的に採取した血漿試料を測定し、本法が PQQ の血中濃度モニタリングに有用であることを示した。

第二章では、キノンの酸化還元サイクルに基づく反応の新たな展開として、酸化還元発色試薬との組み合わせによる UQ の発色定量法の開発を行なった。CL 法は高感度な方法であるが、測定装置が特殊であるといった制限を有する。そこで、より簡便にキノンを検出可能な手法として、CL 試薬に代えて酸化還元発色試薬を用いる測定法を考案した。すなわち、キノンの酸化還元サイクルにより発生するスーパーオキシドアニオンラジカルと酸化還元発色試薬との反応によって生成する色素の UV 吸収を測定するといった原理に基づく方法である。さらにこのとき、UV 吸収の測定をプレートリーダーで行うことにより、多数の試料を一斉かつ迅速に測定できるようにした。最終的に、本法を化粧品中 UQ の定量へと応用した。

## 【第一章】

# ヒト血漿中 PQQ の HPLC-CL 定量法の開発

PQQ はメタノール脱水素酵素をはじめとする様々な酵素の補酵素<sup>3)</sup>として働く水溶性のキノン化合物である。ニコチンアミドとフラビンに次ぐ 3 番目の酸化還元酵素の補酵素として、その機能についてこれまでに多くの研究が行なわれている。1989 年に Killgore らは PQQ が生体機能維持に必要な栄養素であると報告した<sup>28)</sup>。また、2003 年には笠原らによって PQQ が必須アミノ酸であるリジンの分解に必要であることが報告され、PQQ が哺乳類においてビタミン様の働きを有することが示された<sup>29)</sup>。

PQQ はヒト体内において微量ではあるが血漿や臓器等に幅広く分布しており<sup>30)</sup>、特に母乳には比較的高濃度の PQQ が存在しているとされている<sup>31)</sup>。PQQ の生理活性としては、肝臓<sup>32)</sup>や心臓<sup>33)</sup>、脳障害<sup>34)</sup>に対する保護作用、ヒト繊維芽細胞における DNA 合成<sup>35)</sup>や神経成長因子産生<sup>36)</sup>の促進作用等が挙げられる。また、ラジカル消去剤<sup>37, 38)</sup>としての働きや、ヒドロコルチゾン誘発白内障<sup>39)</sup>及び酸化ストレス誘発性の神経変性<sup>40)</sup>の予防効果も報告されている。さらに、アミロイド繊維の生成阻害及び C 末端が切断された  $\alpha$ シヌクレインの凝集を予防することにより、パーキンソン病に対する治療効果も期待されている<sup>41, 42)</sup>。他に、PQQ は NADPH やアスコルビン酸、アミノ酸、グルタチオン等の生体成分により容易に還元され、活性型の PQQH<sub>2</sub>に変化することで強い抗酸化能を示すとされている (Figure 1-1)。一般的な抗酸化物質は活性酸素との反応により活性を失うが、PQQ は生体内において繰り返し抗酸化能を示すことから、生体内の抗酸化機能に重要な役割を持っていると考えられている。このような機能性の高さが注目され、米国では 2008 年から PQQ 含有サプリメントが市販されている。日本でも 2014 年から食品への使用が可能となり、サプリメントといった機能性食品や化粧品に配合されるようになった。

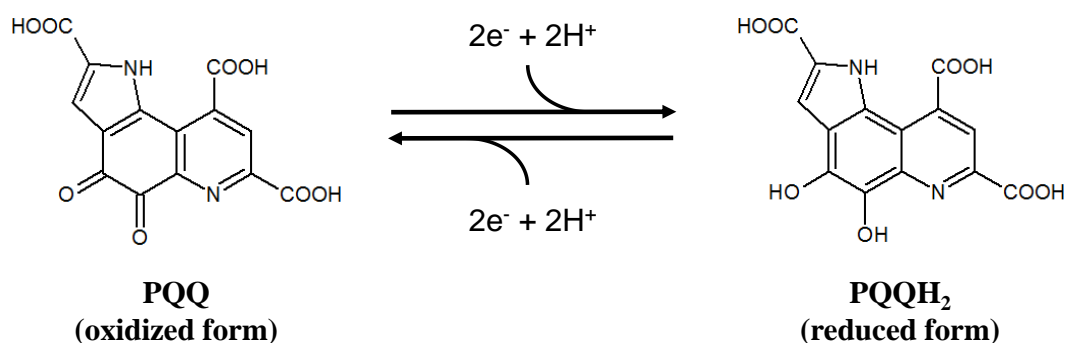


Figure 1-1 Structure of PQQ and its redox reaction.

このように、PQQ は多彩な機能から幅広い分野で注目されている化合物ではあるが、その生理的役割や分布に関しては未解明な点も多い。したがって、PQQ の新たな機能の解明に有用な高感度分析法は、様々な研究分野で必要とされている。

これまでに、PQQ を対象とするいくつかの定量法が報告されている。例えば、キャピラリー電気泳動－紫外可視吸光度 (CE-UV) 法<sup>43)</sup>や電気化学的検出法 (ECD) 法<sup>44)</sup>、サイクリックボルタンメトリー<sup>45)</sup>法といった方法は、PQQ 標準溶液の定量に応用されている。食品中に含まれる PQQ の定量法として、液体クロマトグラフィー－質量分析 (HPLC-MS/MS) 法<sup>46)</sup>やガスクロマトグラフィー－質量分析 (GC-MS) 法<sup>47)</sup>が開発されている。また、求電子性の PQQ を求核性化合物であるアミノ酸と反応させて生じるオキサゾール誘導体を、HPLC<sup>48)</sup> やキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)<sup>49)</sup>による分離後に UV 検出を行なう測定例が報告されている。さらに、ブタやウシ由来の酵素に含まれる PQQ を定量するために、ヒドラゾン誘導体に変換した PQQ を HPLC-UV や LC-MS を用いて測定する方法が開発されている<sup>50)</sup>。一方で、生体組織に存在する微量 PQQ をはじめて定量した例である GC-MS 法<sup>30)</sup>は、フェニルトリメチルアンモニウムヒドロキッドを用いて 100°C で 15 分加熱という過酷な条件下での誘導体化操作や多段階の抽出操作が必要である。さらに、GC-MS の機器の複雑さや運用コストの面からも生体試料中 PQQ の一般的な定量法としての普及に制限があった。

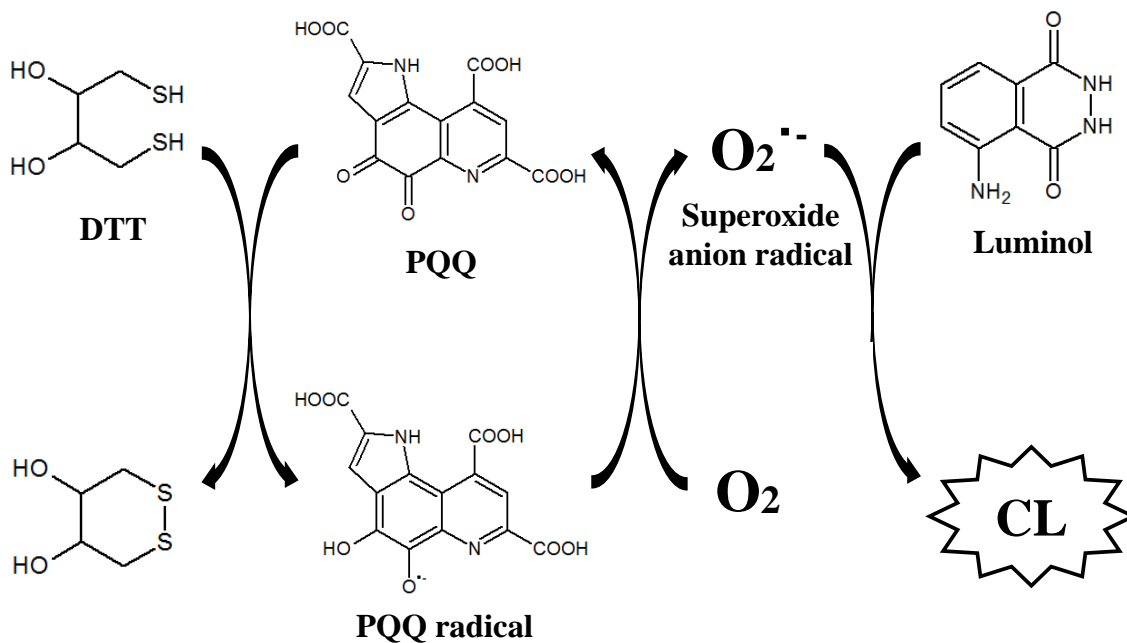
上述したように、これまでに報告されている PQQ の測定法は複雑な機器の使用<sup>44, 46, 47)</sup>や時間と手間のかかる前処理操作が必要<sup>47, 50)</sup>である。また、ヒト血漿のような生体試料中に存在する PQQ は極めて低濃度であるため<sup>30, 51)</sup>、生体成分による妨害を取り除くための複雑な前処理が要求される。したがって筆者は、ヒト血漿中の PQQ 濃度をより簡便かつ高感度に定量可能な新規 HPLC 定量法の開発を試みた。

CL 検出は単純な装置を用いて、微量測定対象物を検出できる高感度な手法である。CL とは、化学反応から生じるエネルギーを受け取ることで生じる励起状態の分子が、安定した基底状態へ戻る際にエネルギーを光として放出する現象である。CL 法は励起光源を必要としないことから、光源由来のノイズや散乱光の影響を受けることなく、高感度な検出が可能となる。筆者の所属する研究室ではこれまでに、キノンの酸化還元サイクルに基づくキノンの CL 定量法を報告してきた<sup>25-27)</sup>。そこで本研究では、キノンである PQQ の高感度定量法の確立のために、この反応に基づく CL 検出を試みた。本研究で確立した方法の測定原理を Scheme 1-1 に示す。PQQ は還元剤ジチオスレイトール (DTT) によって還元され、PQQ ラジカルが生成する。不安定な PQQ ラジカルは溶液中の溶存酸素と反応し、再酸化される過程において、スーパーオキシドアニオンラジカルを発生する。このスーパーオキシドアニオンラジカルを CL 試薬であるルミノールを用いて検出することで、CL 強度として PQQ 濃度を定量可能である。本研究では、この反応と HPLC システムを組み合わせることで、高感度かつ選択的に PQQ を定量可能な、新たな HPLC-CL 定量法を確立した。これまでに PQQ の CL 定量法は開発されておらず、本研究がはじめての報告である。

一方、血漿中の微量 PQQ を抽出する方法としてこれまでに 2 回の液-液抽出と 1 回の固相抽出 (SPE) を組み合わせた前処理法が報告されている<sup>30, 52)</sup>。しかしながら、この方法は非常に複雑で時間も要することから、迅速かつ簡便に PQQ を抽出可能な新たな前処理法が必要と考えられた。そこで、種々の条件を検討し、1 回の SPE 操作で血漿試料から PQQ を良好な回収率で抽出可能な方法を確立するとともに、HPLC-CL 法と組み合わせることで血漿中の微量 PQQ の定量を可能とした。

最終的に、生体内における PQQ 濃度の変化を調査する目的で、本法を PQQ サプリメントを継続的に摂取した健常人ボランティアの血漿中 PQQ の定量へと応用し、サプリメント服用による血漿中 PQQ 濃度の経時的変化を調査した。

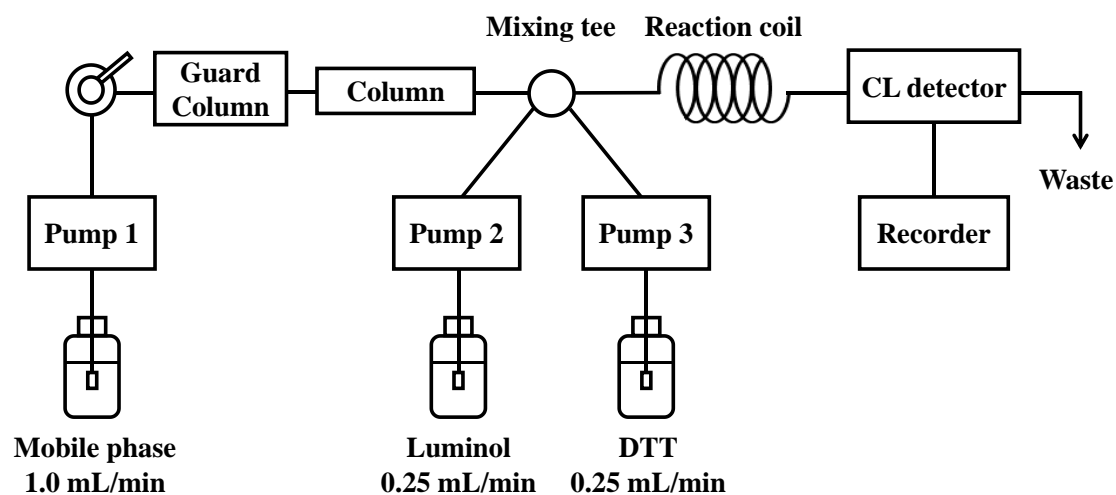




**Scheme 1-1 Mechanism of CL reaction for PQQ based on the generation of superoxide anion radical through the quinone redox cycle.**

## 1-1. HPLC-CL システムの構築

PQQ の酸化還元サイクルに基づく CL 反応を組み込んだ HPLC システムを構築した。Figure 1-2 に HPLC-CL 装置の概略図を示す。PQQ は高極性化合物であるため、HPLC において一般的な逆相カラムには保持されにくい。そこで、PQQ を逆相カラムへ保持させるためのイオンペア試薬として臭化テトラブチルアンモニウム (TBAB) を用いた。移動相として 4 mM TBAB を含む 50 mM トリシュー硝酸緩衝液 (pH 8.8)/アセトニトリル (7/3, v/v) 溶液を流速 1.0 mL/min で送液した。分離カラムとして InertSustain C18 (150 × 4.6 mm i.d., 3 μm)、カラム保護のためのガードカラムとして InertSustain C18 Cartridge Guard Column E (10 × 4.0 mm i.d., 3 μm) を使用した。カラムからの溶出液に、還元剤として 0.15 mM DTT のアセトニトリル溶液及び CL 試薬として 1.5 mM ルミノールの 150 mM 水酸化ナトリウム水溶液を、それぞれ流速 0.25 mL/min で同時に混合した。化学反応を十分に進行させた後に検出を行なうため、混合溶液を内径 0.5 mm 及び長さ 7 m のテフロンチューブ製の反応コイルを通過させた後、CL 検出器へと導入した。



HPLC conditions:

Pump 1, 2: Shimadzu LC-20AD;

Pump 3: Shimadzu LC-20AT;

Sample injector: Rheodyne 7125 (loop, 20  $\mu$ L);

Guard column: InertSustain C18 Cartridge Guard Column E (10  $\times$  4.0 mm i.d., 3  $\mu$ m);

Column: InertSustain C18 (150  $\times$  4.6 mm i.d., 3  $\mu$ m);

Mobile phase: 4 mM Tetrabutylammonium bromide in 50 mM Tris-HNO<sub>3</sub> buffer (pH 8.8)/  
Acetonitrile (7/3, v/v);

Luminol solution: 1.5 mM Luminol in 150 mM NaOHaq;

DTT solution: 0.15 mM DTT in Acetonitrile;

Reaction coil: 7 m  $\times$  0.5 mm i.d.;

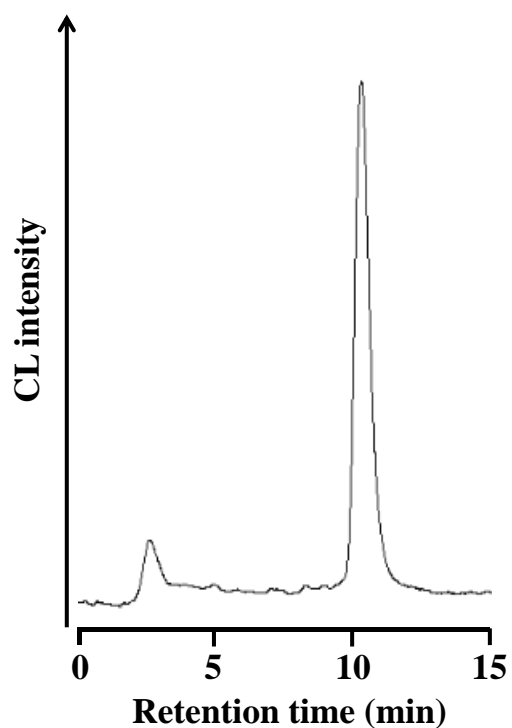
CL detector: Shimadzu CLD-10A;

Recorder: EZChrom Elite.

**Figure 1-2 HPLC system and conditions.**

## 1-2. PQQ 標準溶液のクロマトグラム

Figure 1-2 に示した HPLC システムに、50 nM (1.0 pmol/injection) の PQQ 標準溶液を注入して得られたクロマトグラムを Figure 1-3 に示す。PQQ に由来する CL ピークは保持時間 10.7 分に検出された。



**Figure 1-3 Chromatogram of PQQ standard solution (50 nM) obtained by HPLC-CL detection.**

### 1-3. 測定条件の最適化

より高い感度を得る目的で、PQQ 標準溶液を用いて反応コイル長や各種試薬濃度といった CL 反応条件の最適化を行なった。

#### 1-3-1. 反応コイル

筆者の所属する研究室ではこれまでに、キノンと DTT 及びルミノールの混合後に発生する CL が時間経過とともに徐々に増大することを報告している<sup>25-27</sup>。そこで、より強い CL 強度を得るために、3 液を混合した後にテフロンチューブ製の反応コイルを通過させてから検出を行なうことにした。内径 0.5 mm のチューブを用いて 6.0–8.0 m の範囲でコイル長を検討したところ、ピーク面積は 6.0 m で最も高くなったが、感度の指標となる S/N 比は 7.0 m のときに最大となった (Figure 1-4)。したがって、最適な反応コイル長を 7.0 m とした。

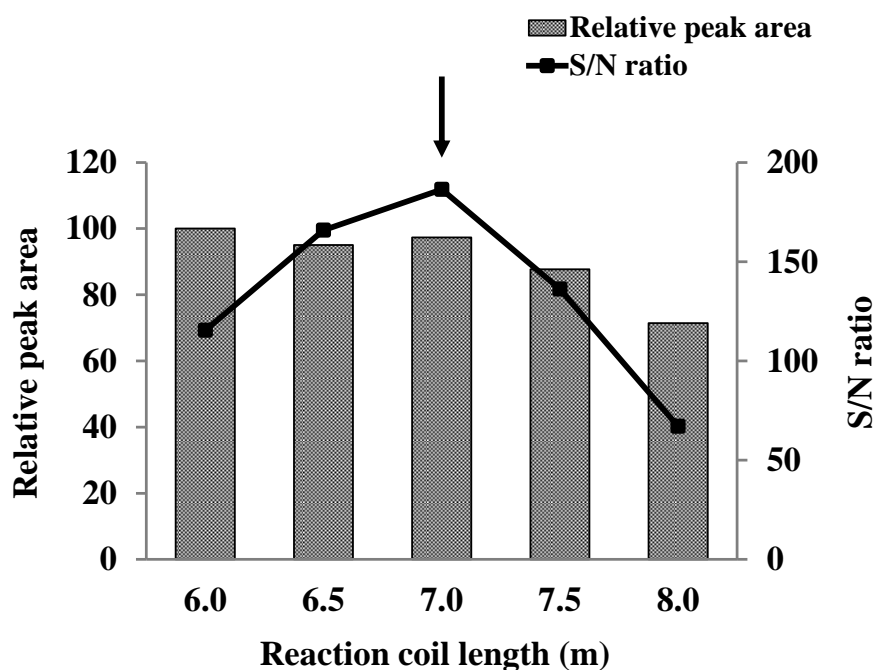
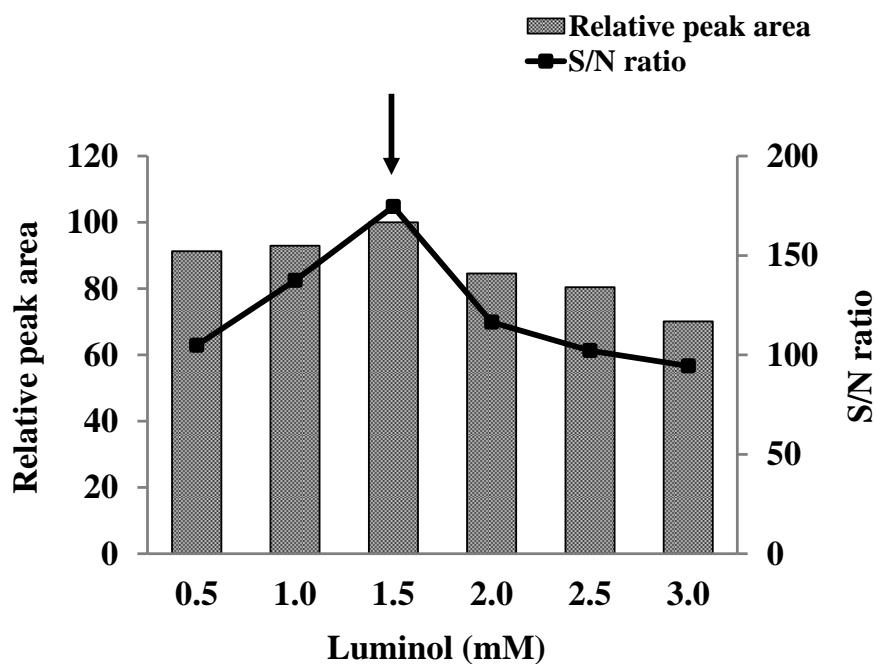


Figure 1-4 Effects of reaction coil length on relative peak area and S/N ratio. The concentrations of PQQ, luminol, NaOH and DTT were 50 nM, 1.5 mM, 200 mM and 0.2 mM, respectively.

### 1-3-2. ルミノール濃度

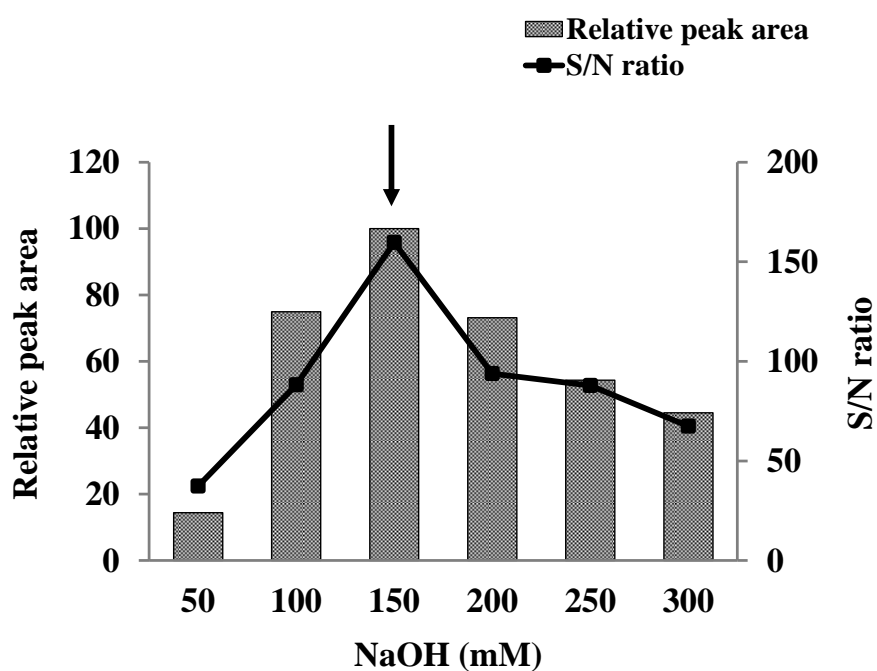
CL 試薬であるルミノールについて 0.5–3.0 mM の範囲で濃度の検討を行なった。Figure 1-5 に示すようにピーク面積及び S/N 比ともに 1.5 mM のとき最大となった。そこで、最適なルミノール濃度として 1.5 mM を選択した。



**Figure 1-5** Effects of luminol concentration on relative peak area and S/N ratio. The concentrations of PQQ, NaOH and DTT were 50 nM, 200 mM and 0.2 mM, respectively. Reaction coil length was 7.0 m.

### 1-3-3. 水酸化ナトリウム濃度

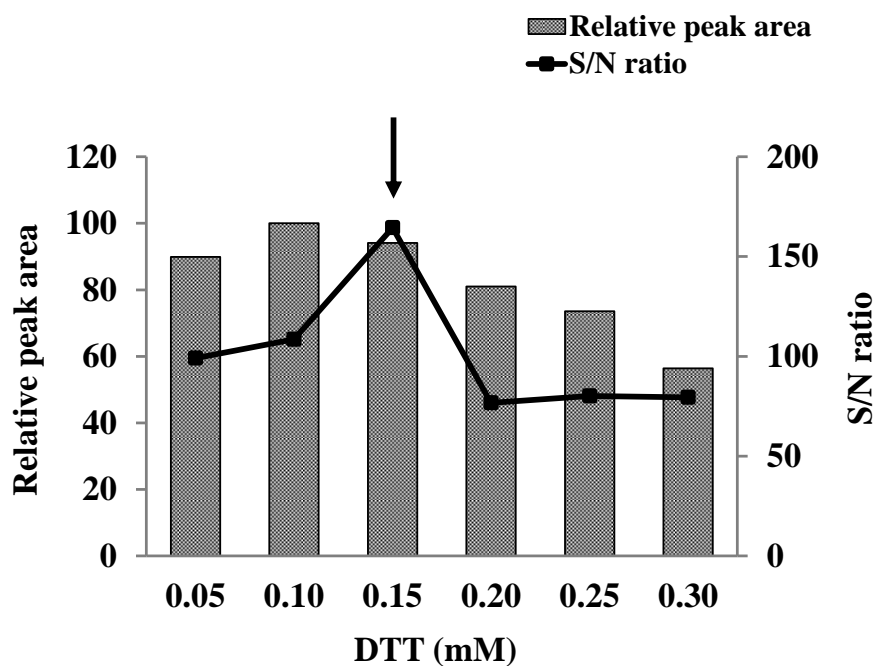
ルミノールの溶媒かつ塩基触媒として用いた水酸化ナトリウム水溶液の濃度について 50–300 mM の範囲で検討を行なった。その結果、Figure 1-6 に示すように濃度の上昇とともにピーク面積及び S/N 比は増大し、150 mM 以降で低下していった。この結果より最適な水酸化ナトリウム濃度として 150 mM を選択した。



**Figure 1-6** Effects of NaOH concentration on relative peak area and S/N ratio. The concentrations of PQQ, luminol and DTT were 50 nM, 1.5 mM and 0.2 mM, respectively. Reaction coil length was 7.0 m.

#### 1-3-4. DTT 濃度

還元剤 DTT について 0.05–0.30 mM の範囲で濃度の検討を行なった。Figure 1-7 に示すようにピーク面積は 0.10 mM のときに最大となった一方、S/N 比は 0.15 mM で最大となったため、最適な DTT 濃度は 0.15 mM とした。



**Figure 1-7** Effects of DTT concentration on relative peak area and S/N ratio. The concentrations of PQQ, luminol and NaOH were 50 nM, 1.5 mM and 150 mM, respectively. Reaction coil length was 7.0 m.



#### 1-4. 検量線及び検出下限

最適条件下において、PQQ 標準溶液を用いて検量線を作成した (Table 1-1). PQQ は 1–100 nM の範囲において濃度とピーク面積との間に相関係数  $r = 0.999$  の良好な直線関係を与えた. また, ノイズの 3 倍のピーク面積を与える PQQ の濃度 ( $S/N = 3$ ) を検出下限と定義したとき, その値は 0.23 nM (4.6 fmol/injection) であった.

**Table 1-1 Calibration curve and limit of detection for PQQ.**

| Linear range (nM) | Calibration Equation*  | Correlation coefficient (r) | LOD (nM) |
|-------------------|--|-----------------------------|----------|
| 1–100             | $Y = (12.8 \pm 1.4) \times 10^4 X - (9.1 \pm 6.7) \times 10^4$ | 0.999                       | 0.23     |

\*Y = Peak area, X = Concentration of PQQ (nM)

## 1-5. 血漿試料の前処理操作

本法の生体試料分析への応用として、ヒト血漿中に含まれる PQQ の定量を試みた。血漿中に存在する PQQ は極めて低濃度であるだけでなく、血漿成分にはタンパク質をはじめとする検出の妨げとなる夾雑成分が含まれていることから、分析前に適切な前処理を行なう必要がある。そこで、血漿中の微量 PQQ の定量を目的とした前処理法の検討を行なった。

鈴木ら<sup>52)</sup>は生体試料からの PQQ 抽出法として、液-液抽出と SPE を組み合わせた前処理法を報告している。この方法では生体試料中の PQQ を有機層に抽出後、再び水層に逆抽出する 2 段階の液-液抽出が行なわれている。さらに、抽出液に塩酸を加えて試料を酸性化した後、C18 固相抽出カートリッジを用いた SPE が適用されている。このとき検討した肝臓、脳及び血漿試料からの PQQ 回収率は、それぞれ 50%、75%、105% であった。この抽出法は熊澤ら<sup>30)</sup>が報告した GC-MS による生体試料中 PQQ の定量法にも用いられている。しかしながら、この方法は 2 段階の液-液抽出と SPE 抽出操作に時間と労力を要することから、より簡便な血漿中 PQQ の抽出法について検討することにした。

まず初めに、酢酸エチルを用いる 1 段階の液-液抽出を試みたが、PQQ が酢酸エチル層へ十分に移行せず、PQQ 由来のピークを検出することができなかった。そこで、鈴木ら<sup>52)</sup> 及び Meer ら<sup>53)</sup>の報告を参考に SPE を検討することにした。PQQ を酸化型の状態で抽出するため、血漿試料 200  $\mu$ L に塩酸で pH 2.0 に調整したリン酸二水素ナトリウム水溶液を 200  $\mu$ L 加えて酸性化した。固相抽出カートリッジは、疎水性相互作用に基づく固相の中で最も一般的な C18 カートリッジ (BOND ELUT-C18, 500 mg/3 mL, アジレント) を選択した<sup>54)</sup>。

洗浄及び溶出溶媒の検討にあたり、報告された手順にしたがって洗浄溶媒として水、溶出溶媒として 5% ピリジンを用いたところ、PQQ が溶出されなかった。このとき、洗浄溶媒としてアセトニトリルやアセトニトリル水溶液 (10-50%) も検討したが、いずれも PQQ は溶出されなかった。一方で、水による洗浄の後に 5% ピリジンを 2 回カートリッジに通液すると、2 回目の 5% ピリジン溶液から PQQ が良好に検出された。そこで、洗浄溶媒として水と 5% ピリジンを組み合わせることにした。一方、溶出溶媒として 5% ピリジンを用いることで良好な回収率は得られたものの、ピリジンは HPLC システムの測定に適した溶媒ではない。したがって、新たな溶出溶媒として水や 30% アセトニトリル水溶液、移

動相を検討した (Figure 1-8). その結果, 5% ピリジンと同等の回収率が得られた 30% アセトニトリルを溶出溶媒として選択した. 溶出溶媒のアセトニトリル含量は移動相と同じ 30% であり, 蒸発乾固及び移動相による再溶解をすることなく, 溶出液を直接 HPLC へと注入可能となった.

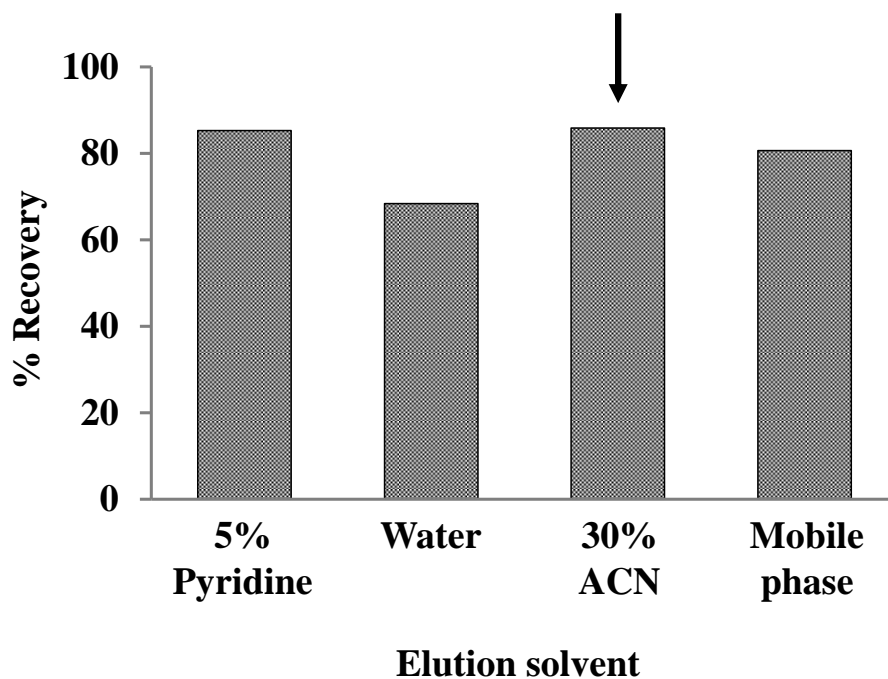


Figure 1-8 Effects of elution solvents on PQQ recovery from SPE.

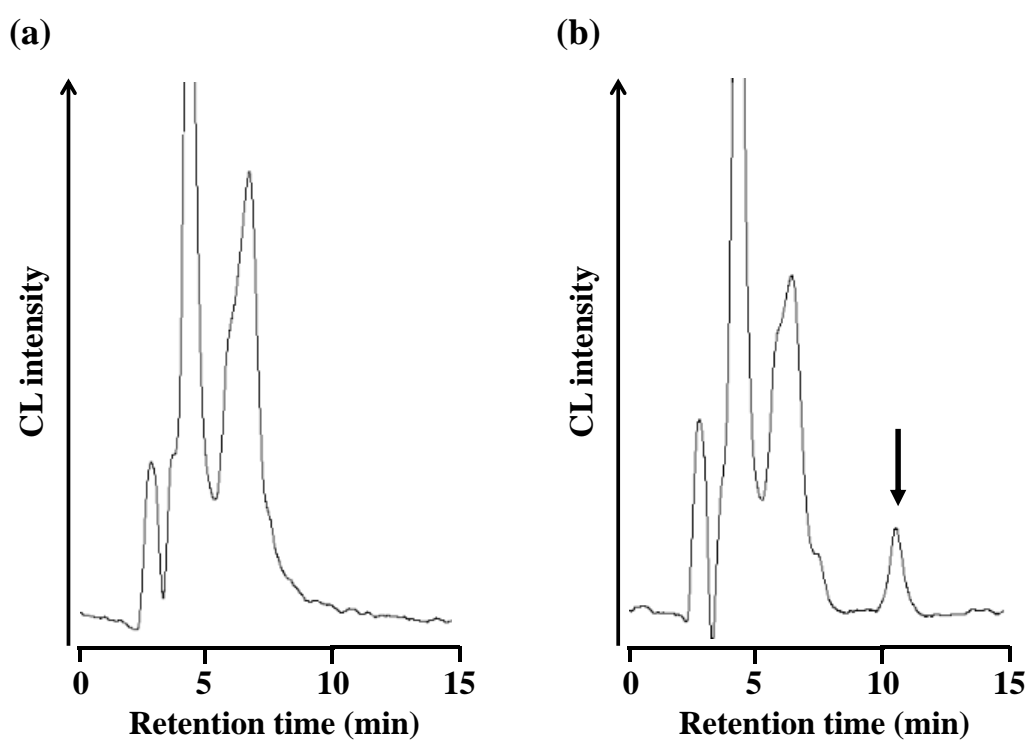
検討の結果、最も高い回収率を得られた SPE 条件を含む前処理操作を Chart 1-1 に示す。メタノール 4.0 mL 及び水 4.0 mL でコンディショニングを行なったカートリッジ (500 mg/3 mL) に、酸性化した血漿試料を 300  $\mu$ L 導入した。次に、水 2.0 mL 及び 5% ピリジン 600  $\mu$ L を用いてカートリッジを洗浄後、30% アセトニトリル 600  $\mu$ L で溶出し、そのうち 20  $\mu$ L を HPLC システムに注入した。このとき、前処理操作によって試料中 PQQ 濃度は 4 倍に希釈されるため、血漿試料中の濃度は SPE 後の試料濃度を 4 倍することで算出した。

**Chart 1-1 Pretreatment procedure for the determination of PQQ in human plasma.**

|  |             |
|--|-------------|
| Plasma   | 200 $\mu$ L |
| ← 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /HCl (pH 2.0) | 200 $\mu$ L |
| Vortex for 60 s                                      |             |
| Load onto the cartridge (C18, 500 mg/3 mL)           | 300 $\mu$ L |
| Wash 1 Water   | 2.0 mL      |
| Wash 2 5% Pyridine                                   | 600 $\mu$ L |
| Elute 30% Acetonitrile                               | 600 $\mu$ L |
| Inject into HPLC system                              | 20 $\mu$ L  |

## 1-6. ヒト血漿中 PQQ のクロマトグラム

Figure 1-9(a) に PQQ を添加していないヒト血漿, Figure 1-9(b) に 40 nmol/L plasma となるように PQQ を添加したヒト血漿を測定して得られたクロマトグラムを示す. 本法はキノンの酸化還元サイクルに基づく検出法であるため, ビタミン K 類や UQ 等の内因性キノンが検出を妨げる可能性が考えられた. しかしながら, 分離条件の最適化及び SPE により, 共存する夾雑成分の影響を受けることなくヒト血漿中の PQQ を選択的に検出可能であることが示された.



**Figure 1-9** Chromatograms of (a) blank human plasma and (b) human plasma spiked with PQQ (40 nmol/L plasma) obtained by HPLC-CL detection.

## 1-7. 添加検量線及び検出下限

PQQ を添加したヒト血漿を用いて添加検量線を作成した (Table 1-2). その結果, 4–400 nmol/L plasma の範囲において, 濃度とピーク面積との間に相関係数  $r = 0.998$  の良好な直線関係が得られた. またノイズの 3 倍のピーク面積を与える PQQ の濃度 ( $S/N = 3$ ) を検出下限と定義したとき, その値は 1.08 nmol/L plasma であった. これは SPE 後の試料中 PQQ 濃度に換算すると 0.27 nM (5.4 fmol/injection) に相当する. 本法の感度をこれまでに報告されている PQQ 定量法と比較したところ (Table 1-3), GC-MS 法<sup>30)</sup>と比べて 5 倍, CE-UV 法<sup>43)</sup>と比べて 20000 倍, HPLC-ECD 法<sup>44)</sup>と比べて 2000 倍, HPLC-UV 法<sup>48)</sup>と比べて 200 倍, CZE-UV 法<sup>49)</sup>と比べて 400 倍高感度であった. LC-MS/MS 法<sup>46)</sup>と比較するとやや低感度であったが, 本法はより簡便な装置で複雑な前処理を行なうことなく PQQ を高感度に定量可能という特徴を有する.

**Table 1-2 Calibration curve and limit of detection for PQQ using human plasma spiked with PQQ.**

| Linear range<br>(nmol/L plasma) | Calibration<br>equation*                                      | Correlation<br>coefficient (r) | LOD<br>(nmol/L plasma) |
|---------------------------------|---|--------------------------------|------------------------|
| 4–400                           | $Y = (2.7 \pm 0.2) \times 10^4 X + (4.3 \pm 2.9) \times 10^4$ | 0.998                          | 1.08                   |

\*Y = Peak area, X = Concentration of PQQ (nmol/L plasma)

**Table 1-3 Critical comparison of the performance of the proposed and reported methods.**

| Method                         | Reagent, temperature<br>/reaction time              | Sample   | %Recovery | LOD, nM<br>(fmol/injection) | Ref.           |
|--------------------------------|---|--|-----------|-----------------------------|----------------|
| CE-UV                          | No reaction   | Mixture of PQQ derivatives                               | N/A*      | 7000                        | 43             |
| HPLC-ECD                       | No reaction   | Standard solution  | N/A*      | (10000)                     | 44             |
| HPLC-UV,<br>Cyclic voltammetry | No reaction   | Standard solution  | N/A*      | N/A*                        | 45             |
| LC-MS/MS                       | No reaction   | Foods  | 30–40     | (1.5)                       | 46             |
| GC-MS                          | Phenyl trimethylammonium hydroxide,<br>100°C/15 min | Foods<br>/biological tissues and fluids                  | >50       | 1.5                         | 30<br>47       |
| HPLC-UV                        | Neurotransmitter amino acids,<br>37°C/24 h          | Amino acids incubations                                  | N/A*      | 50                          | 48             |
| CZE-UV                         | Amino acids,<br>room temperature/24 h               | Growth medium of bacteria<br>and amino acids incubations | N/A*      | 100                         | 49             |
| HPLC-UV and MS                 | Phenylhydrazine or<br>2,4-Dinitrophenyl-hydrazine   | Enzymes of pig and bovine                                | 5–33      | N/A*                        | 50             |
| HPLC-CL                        | Luminol and DTT,<br>room temperature                | Human plasma   | 95–100    | 0.27<br>(5.4)               | This<br>method |

\*N/A: data is not available.

## 1-8. 回収率と日内及び日間の再現性

FDA のガイドラインにしたがって本法のバリデーションを行なった<sup>55)</sup>。検量線範囲内における 3 点の濃度において、日内及び日間におけるヒト血漿中 PQQ の回収率を調査し、真度及び精度を算出した (Table 1-4)。その結果、真度は日内で 96.8–100.3%、日間で 95.2–97.5% であり、本法の回収率は他法と比較して極めて良好であることが示された。次に、日内及び日間の繰り返し測定精度を算出したところ、日内の精度は相対標準偏差 (RSD) 6.1% 以下、日間の精度は RSD 5.6% 以下と良好な結果を示した。また、低濃度 (4 nmol/L plasma) の試料において、真度及び精度ともに FDA のガイダンスで定められた基準を満たしたことから、4 nmol/L plasma を血漿試料における LOQ とした。

**Table 1-4 Accuracy and precision of the proposed method using human plasma spiked with PQQ.**

| Spiked conc.<br>(nmol/L plasma) | Found conc.<br>(nmol/L plasma) | Accuracy<br>(%) | Precision<br>(%RSD) |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------|---------------------|
| Intra-day (n = 5)               |                                |                 |                     |
| 4                               | 4.01                           | 100.3           | 5.5                 |
| 40                              | 38.9                           | 97.3            | 1.6                 |
| 200                             | 193.6                          | 96.8            | 6.1                 |
| Inter-day (n = 5)               |                                |                 |                     |
| 4                               | 3.81                           | 95.2            | 5.6                 |
| 40                              | 39.0                           | 97.5            | 1.9                 |
| 200                             | 194.8                          | 97.3            | 3.3                 |



### 1-9. 血漿中における PQQ の安定性

血漿中における PQQ の安定性を, 20 及び 200 nmol/L plasma となるように PQQ を添加したヒト血漿を用いて調査した. 室温での安定性として, 添加後 1 時間及び 4 時間の短期安定性と添加後 24 時間の長期安定性を調査した. また, 冷凍条件での安定性として  $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で 7 日間経過後の試料, 及び 3 回凍結融解を繰り返した試料に含まれる PQQ を測定した (Table 1-5). その結果, PQQ の回収率はいずれの濃度においても 81.8% 以上であり, 血漿中での PQQ の良好な安定性が確認された.

**Table 1-5 Stability of PQQ in human plasma.**

| Condition                | % Recovery       |                   |
|--------------------------|------------------|-------------------|
|                          | 20 nmol/L plasma | 200 nmol/L plasma |
| Room temperature (1 h)   | 104.4            | 100.2             |
| Room temperature (4 h)   | 95.7             | 99.5              |
| Room temperature (24 h)  | 81.8             | 98.5              |
| Frozen at for 7 days     | 108.9            | 84.8              |
| Three freeze-thaw cycles | 98.0             | 87.7              |

## 1-10. ヒト血漿中 PQQ 濃度の変動

PQQ 服用後の生体内における PQQ 濃度の変化を調査する目的で、PQQ 含有サプリメントを服用した健常人被験者から経時的に血漿を採取し、その中に含まれる PQQ 濃度の定量を行なった。なお、本研究は長崎大学大学院医歯薬学総合研究科倫理審査委員会の承認を受けて行なっている (承認番号 37)。

### 1-10-1. 実験概要

健常人被験者 6 名について、1 日 1 回、10 錠 (総 PQQ 100 mg) の PQQ 含有サプリメント<sup>56)</sup>を一週間連続服用した。採血は (1) 1 日目服用前、(2) 1 日目服用 3 時間後、(3) 1 日目服用 24 時間後、さらに 6 日間連続服用後の (4) 7 日目服用前、(5) 7 日目服用 3 時間後の計 5 回行なった (Figure 1-10)。

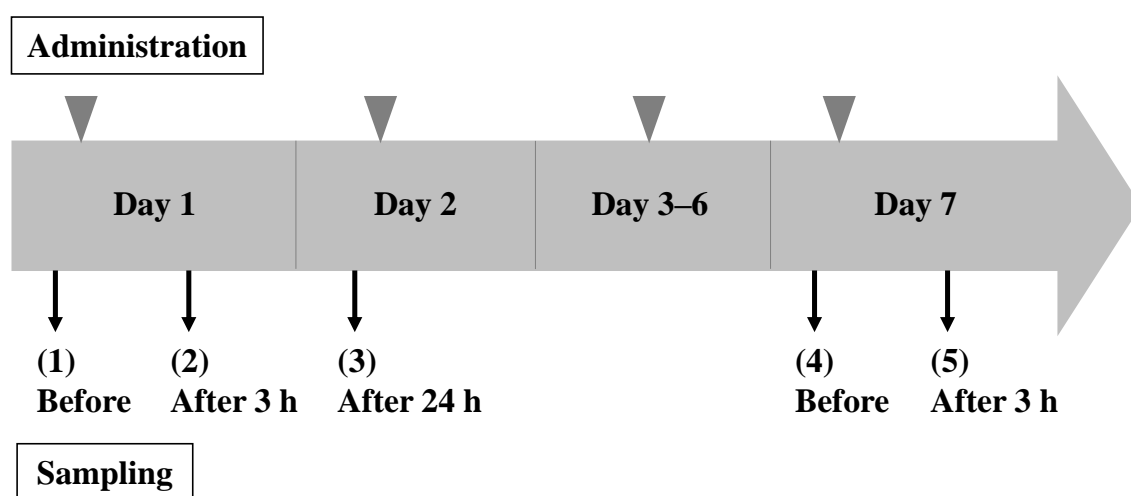
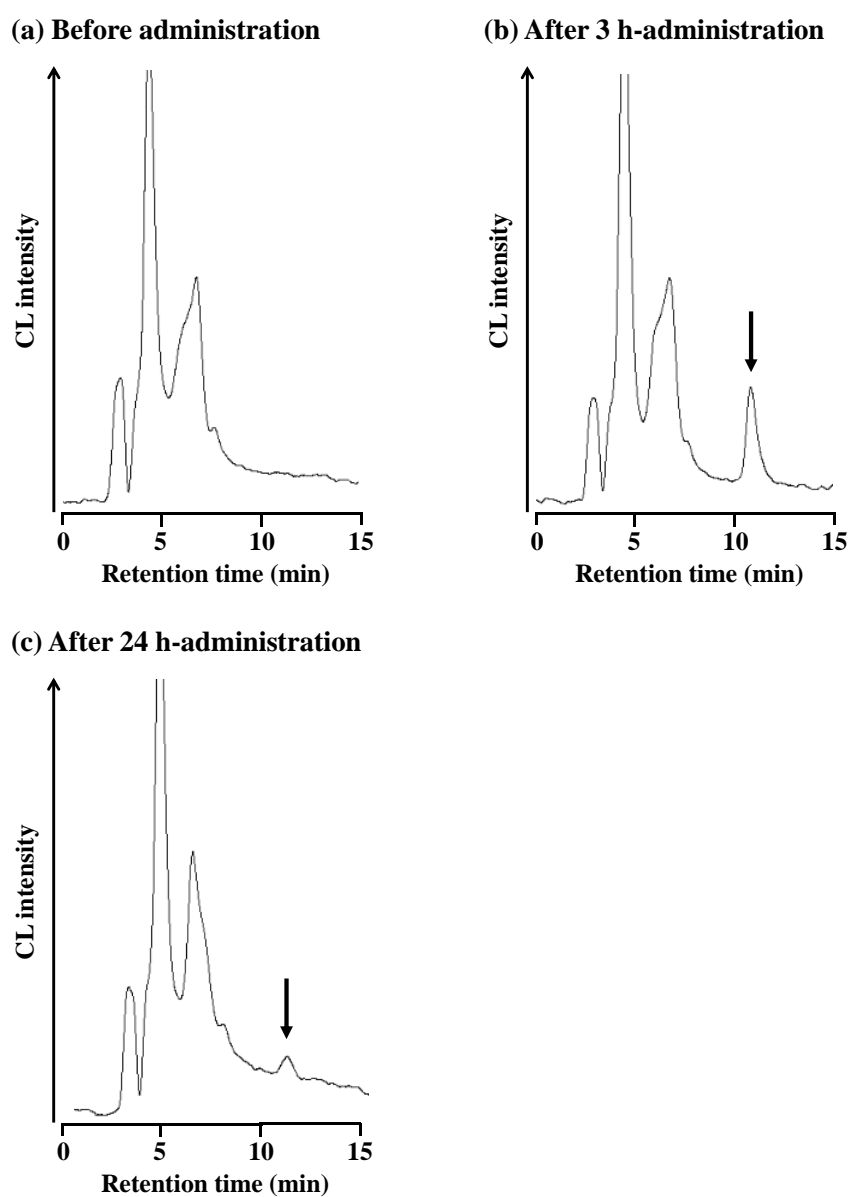


Figure 1-10 Supplement administration and blood sampling schedule.

## 1-10-2. サプリメント服用血漿のクロマトグラム

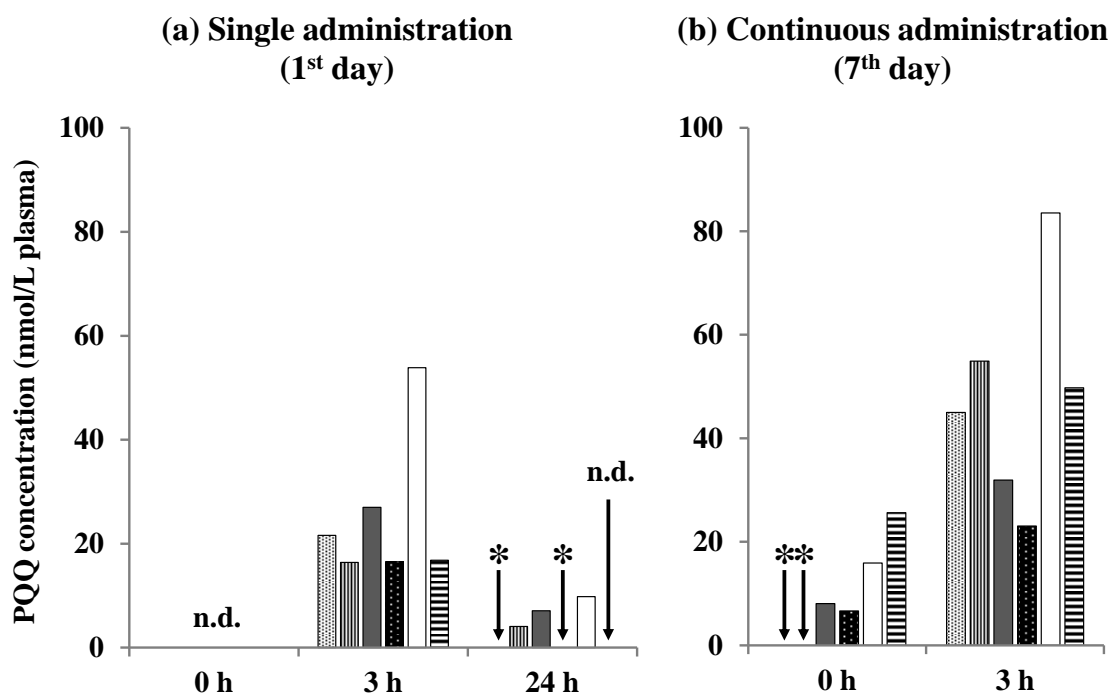
Figure 1-11 に採取した血漿試料の典型的なクロマトグラムを示す。サプリメント服用前の血漿から PQQ は検出されなかった一方で (Fig. 1-11(a)), 服用 3 時間後の血漿からは PQQ に由来するピークが確認された (Fig. 1-11(b)). また, 服用 24 時間後の血漿からは微量の PQQ が検出された (Fig. 1-11(c)). この結果から, 本法は PQQ の血中濃度モニタリングに有用であることが示された。



**Figure 1-11** Chromatograms of human plasma sample (a) before, (b) after 3 h- and (c) after 24 h-administration of PQQ supplements.

### 1-10-3. サプリメント服用による血漿中 PQQ 濃度の変化

健康人被験者 6 名における PQQ サプリメント服用後の血漿中 PQQ 濃度の推移を Figure 1-12 に示す. サプリメント服用前の血漿からは, いずれも本法で検出可能な濃度の PQQ は検出されなかった (Fig. 1-12(a)). 一方, 服用 3 時間後ではすべての被験者の血漿から PQQ が検出され, サプリメントの服用によって PQQ が血中へ移行し, その濃度が大幅に上昇することが確認された. 服用 24 時間後の血漿からは半数の検体から PQQ が検出されたものの, 服用 3 時間後と比較してその濃度は大きく低下していた.



**Figure 1-12 PQQ concentration in plasma samples collected from six individuals on (a) the 1<sup>st</sup> and (b) 7<sup>th</sup> day of the experiment. Each bar shows the PQQ concentration in individuals' plasma at each sampling and n.d. means not detected. \* Indicates that the measured concentration lies between the LOD and the LOQ.**

その後一週間継続してサプリメントを服用し、6日目の服用から24時間後に相当する7日目の服用前に4回目の採血を行なった。このときの血漿中PQQ濃度は6.6–25.6 nmol/L plasmaであり (Fig. 1-12(b)), 同様に前回の服用から24時間後に相当する3回目の採血時の定量値 (4.1–9.8 nmol/L plasma) と比較して高い値を示す検体が存在していた。引き続き、再びサプリメントを服用してから3時間後に5回目の採血を行なった。このときの血漿からは23.5–83.5 nmol/L plasmaのPQQが検出され、この値は1日目の服用3時間後の血漿中濃度と比較して高い値を示す傾向にあった。したがって、PQQサプリメントの連続服用は、PQQの血漿中濃度を恒常的に上昇させている可能性が示唆された。また、Table 1-6に示すように血漿中のPQQ濃度には個人差が大きく見られた (RSD: 41.3–62.1%)。これはHarrisら<sup>51)</sup>の報告 (RSD: 約70.3%) と一致する結果であり、PQQ代謝の個人差に起因するものと考えられる。

**Table 1-6 PQQ concentration in plasma samples collected from six individuals on the 1<sup>st</sup> and 7<sup>th</sup> day of the experiment.**

| Day                 | Time | Range<br>(nmol/L plasma, n = 6) | Mean ± SEM***<br>(nmol/L plasma, n = 6) |
|---------------------|------|---------------------------------|---|
| 1 <sup>st</sup> day | 0 h  | n.d.*                           | n.d.*                                   |
|                     | 3 h  | 16.4–53.8                       | 25.4 ± 5.9                              |
|                     | 24 h | n.d.*–9.8                       | 7.0 ± 1.7                               |
| 7 <sup>th</sup> day | 0 h  | Trace**–25.6                    | 14.0 ± 4.4                              |
|                     | 3 h  | 23.0–83.5                       | 48.0 ± 8.6                              |

\* n.d. means not detected

\*\* Trace means that the value lies between LOD and LOQ

\*\*\* SEM is the standard error of mean

## 1-11. 小括

本章では、キノンの酸化還元サイクルによって発生するスーパーオキシドアニオンラジカルをルミノール CL 検出する原理に基づく、高感度かつ選択的な PQQ の HPLC-CL 定量法を開発した。各種測定条件の最適化後、PQQ 標準溶液を用いて検量線を作成したところ、1-100 nM の範囲において濃度とピーク面積との間に良好な直線関係が得られ、検出感度は 0.23 nM (4.6 fmol/injection) であった。本法は、他法と比較して比較的簡便な装置で誘導体化等の複雑な前処理操作を行なうことなく PQQ の高感度な定量が可能であった。

次に、本法の生体試料分析への応用として、ヒト血漿中に含まれる PQQ の定量を行なった。血漿中 PQQ の抽出法として SPE 法を新たに検討することにより、共存する夾雑成分の影響を受けることなく血漿中の PQQ を選択的に定量可能となった。続いて、PQQ サプリメントを服用した健常人被験者から経時的に採取した血漿中に含まれる PQQ の定量を行なった。その結果、サプリメント服用前の血漿から PQQ は検出されなかった一方で、服用 3 時間後の血漿からは PQQ 由来のピークが検出され、サプリメントの服用により PQQ が血中へ移行していることが明らかとなった。また、PQQ サプリメントを一週間継続して服用した被験者では、血漿中 PQQ 濃度が単回服用時と比較して高い値を維持する傾向にあった。このように、本法は経時的な PQQ の血中濃度モニタリングに有用であることが示された。

本研究は、比較的簡便な HPLC システムを用いて生体試料中に含まれる PQQ を CL 定量した初めての例である。今後、母乳といった他の生体試料に応用することで、PQQ のより詳細な体内分布の解明に適用できると考えている。

## 【第二章】

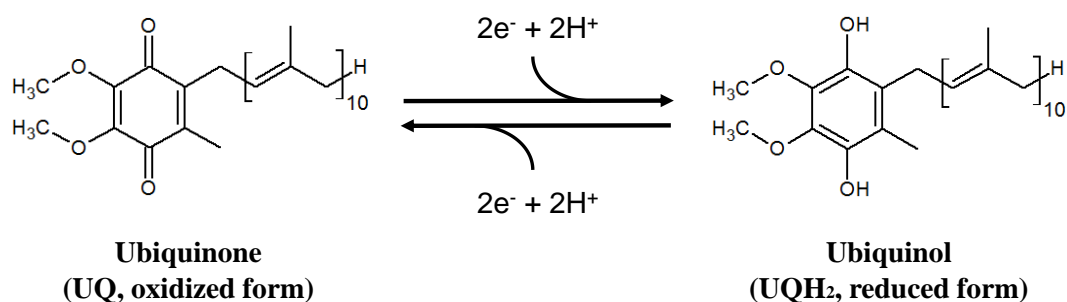
### UQ の発色定量法の開発

UQ (CoQ10)は、1957年にウシ心筋ミトコンドリア電子伝達系の構成成分として発見された脂溶性の抗酸化物質である。UQは主に細胞中のミトコンドリア内膜に存在しており、酸化還元サイクルを介した電子伝達系の活性化によりATPの生合成を賦活化する役割を担っている<sup>1,2)</sup>。UQには酸化型(ubiquinone)と還元型(ubiquinol)が存在し(Figure 2-1)、生体内では還元型が抗酸化作用を示す。外部から摂取したUQは小腸から吸収され、リンパ管へ移行する過程で還元型に変換される<sup>57)</sup>。実際に、血漿中や組織中に存在するUQの多くが還元型で存在していることが報告されている<sup>58,59)</sup>。生体内のUQ量は加齢によって減少し<sup>60)</sup>、さらに健常人と比較して糖尿病等の疾患群では還元型の割合が低下していることが知られている<sup>61)</sup>。これはUQの生合成量の減少や還元型UQへの変換効率の低下によるものだと考えられている。このようなことから、酸化型UQと還元型UQの比は生体内の酸化ストレスを評価する重要な指標といえる<sup>62)</sup>。

UQは体内に広く分布しているが、とくにUQ濃度が高い臓器の一つに心臓が挙げられる。UQ投与による心筋症ラットの心機能低下の抑制効果<sup>63)</sup>や、心不全患者の死亡率低下と運動能力改善効果<sup>64)</sup>等が報告されており、その効果から日本においては軽・中程度までのうっ血性心不全症状に対する治療薬(ノイキノン®)として使用されている<sup>65)</sup>。さらに、UQの新たな効能に関する研究は現在も幅広く行われている。例えば、UQの服用により高血圧患者の収縮期及び拡張期の血圧が減少したとの報告<sup>66)</sup>や、II型糖尿病患者への酸化型あるいは還元型UQ投与によってHbA1cが有意に低下したとの報告もある<sup>67,68)</sup>。この他にも、パーキンソン病<sup>69)</sup>や炎症<sup>70)</sup>に対する治療効果も期待されている。さらに、UQの細胞膜に対する酸化ダメージの予防効果についても報告されている<sup>71)</sup>。リン脂質からなる細胞膜は活性酸素による酸化ダメージを受けやすい性質を有するが、還元型UQはそれ自身、あるいは $\alpha$ -トコフェロールやアスコルビン酸といった他の抗酸化物質を活性化することで細胞膜を酸化から防ぐと考えられている。

このようにUQは幅広い生理活性を有しており、日本ではその高い抗酸化作用を期待したUQ配合化粧品が数多く市販されている。さらに、2001年にはUQの食品添加物としての使用が認可され、サプリメントとして手軽に摂取することが可能となった。





**Figure 2-1 Structure of UQ and its redox reaction.**

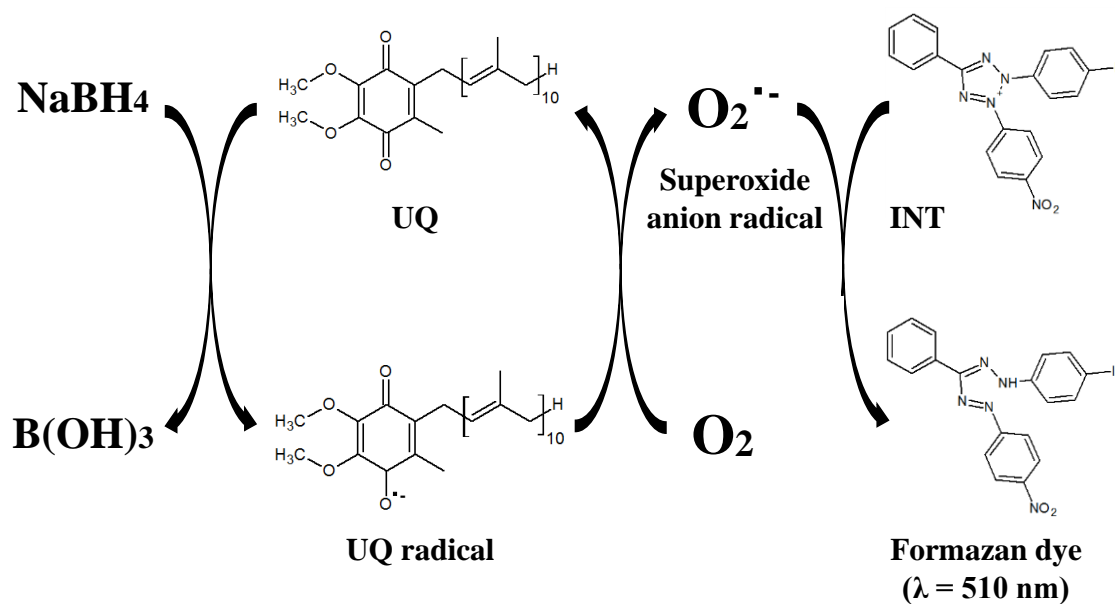
これまでに UQ の定量法として吸光光度法<sup>72)</sup>や核磁気共鳴法 (<sup>1</sup>H NMR)<sup>73)</sup>, HPLC-UV<sup>74)</sup>や ECD<sup>75, 76)</sup>, タンデム型質量分析計 (MS/MS)<sup>77)</sup>を組み合わせた手法が報告されてきた. しかし, 一般的に <sup>1</sup>H NMR 法は感度が十分でなく, 吸光光度法及び HPLC-UV 法は感度に加えて選択性にも欠ける. HPLC-ECD 法は感度及び選択性の高さから UQ の一般的な定量法であるが, 測定前に化学的もしくは電気化学的手法によって還元する必要がある. LC-MS/MS 法は高感度かつ選択的ではあるが, 複雑で高価な機器が必要といった欠点を有する.

筆者の所属する研究室ではこれまでに, UQ の定量法としてキノンの酸化還元サイクルを利用する CL 定量法を確立し, 医薬品や血漿試料中に含まれる UQ の高感度定量に応用した例を報告している<sup>25, 26)</sup>. 第一章で述べたように, CL 定量法は非常に高感度な定量が可能である一方で, 発光の減衰が早い点や, 測定条件の影響を受けやすく, 再現性が低いといった欠点を有している. そこで, ここではキノンと還元剤の反応の新たな展開として, 特殊な検出器を必要とせず, 迅速に化粧品やサプリメント中の UQ の測定が可能なキノンの酸化還元サイクルに基づく発色定量法の開発を試みた.

本法の測定原理を Scheme 2-1 に示す. UQ は還元剤 NaBH<sub>4</sub> との反応によって UQ ラジカルへと変化し, これが溶液中の溶存酸素との反応によって再酸化される過程においてスーパーオキシドアニオンラジカルが発生する. 本法では, UQ の反応により発生するスーパーオキシドアニオンラジカルを, CL 試薬に代えて酸化還元発色試薬である Iodonitrotetrazolium chloride (INT) により検出する. INT はスーパーオキシドアニオンラジカルとの反応によって桃色を呈するホルマザン色素<sup>78)</sup>に変換され, λ=510 nm に強い UV 吸収を持つようになる. ホルマザン

色素の吸光度は UQ の濃度に応じて増加することから、本原理を用いて UQ の定量が可能となる。

本研究では測定迅速性と簡便性を考慮して、生じるホルマザン色素の吸光度測定をマイクロプレートリーダーにより行うことにした。最初に、各種発色反応条件を最適化した後で本法の分析性能の評価を行なった。さらに、開発した方法の実試料分析への応用として、化粧品中に含まれる UQ の定量を行なった。



Scheme 2-1 Mechanism of colorimetric method for UQ based on its redox cycle.

## 2-1. 発色反応の確認

本法は、還元剤  $\text{NaBH}_4$  による UQ の還元とそれに続く再酸化過程において発生するスーパーオキシドアニオンラジカルを、酸化還元発色試薬 INT から生成するホルマザン色素の呈色によって検出する原理に基づいている。まず初めに、本発色反応により実際に UQ が検出可能であるかの確認を行なった。

用手法により、UQ、 $\text{NaBH}_4$  及び INT を混合後、反応溶液の吸光度を 400–600 nm の範囲で測定した。Figure 2-2 に UQ を含む反応溶液、及び含まない試薬ブランク溶液の吸収スペクトルを示す。UQ を含む反応溶液では、 $\lambda = 510 \text{ nm}$  においてホルマザン色素の生成に伴う強い吸収が観察された。一方で、UQ を含まないブランク溶液からは吸収が観察されなかった。したがって、本発色反応により UQ が検出可能であることが示された。

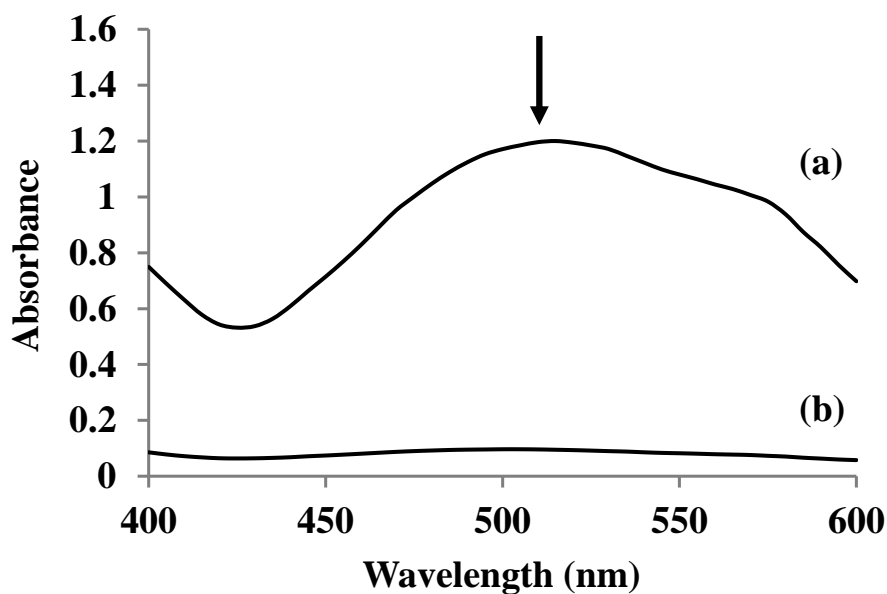


Figure 2-2 UV absorption spectra of (a) reaction mixture and (b) reagent blank.

次に、0–4.0  $\mu\text{M}$  の範囲において UQ の濃度を変えて吸収スペクトルを測定した。その結果、Figure 2-3 に示すように UQ 濃度の増加に伴って  $\lambda = 510 \text{ nm}$  における吸光度が増加した。したがって、本原理を用いた UQ の定量が可能であると考えられた。

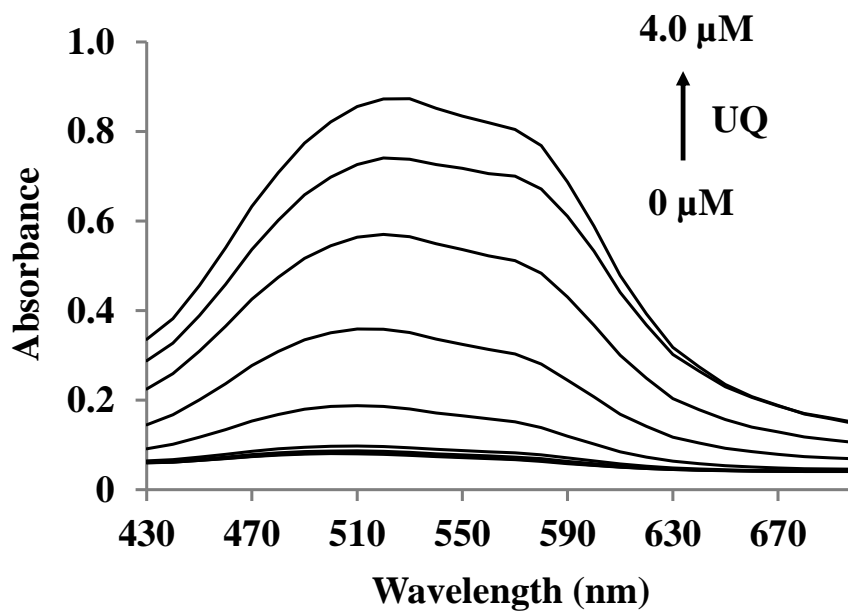
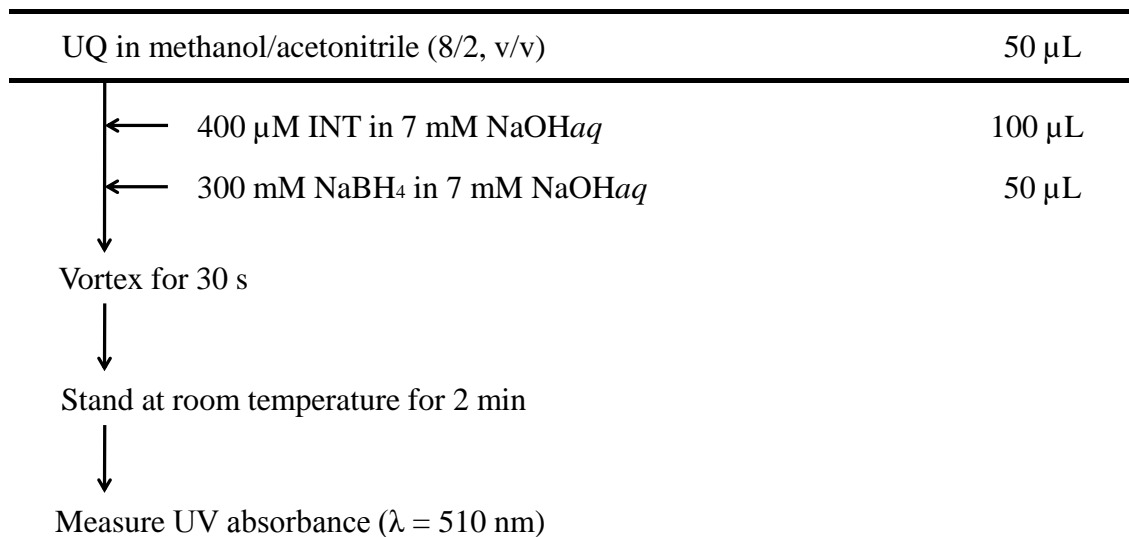


Figure 2-3 UV absorption spectra of different concentration of UQ.

## 2-2. 測定操作

本発色反応を用いたマイクロプレートアッセイによる UQ の測定操作手順を Chart 2-1 に示す。まず初めに UQ の溶媒を検討したところ、有機溶媒の混合溶液を用いた際に吸光度が増大した。その中で、最も反応が早く進行したメタノールとアセトニトリルの混合溶液について、混合比率を検討し、最も強い吸光度が得られたメタノール/アセトニトリル (8/2, v/v) 溶液を溶媒として選択した。96 ウェルプレートのウェルに UQ のメタノール/アセトニトリル (8/2, v/v) 溶液 50  $\mu$ L, 400  $\mu$ M INT の 7 mM 水酸化ナトリウム水溶液 100  $\mu$ L 及び 300 mM NaBH<sub>4</sub> の 7 mM 水酸化ナトリウム水溶液 50  $\mu$ L を順次添加し、プレートリーダーにセットした。プレートリーダー内で 30 秒間攪拌して 2 分間静置後に、反応により生成するホルマザン色素の  $\lambda = 510$  nm における吸光度を測定した。

**Chart 2-1 Assay procedure for UQ based on the generation of formazan dye.**

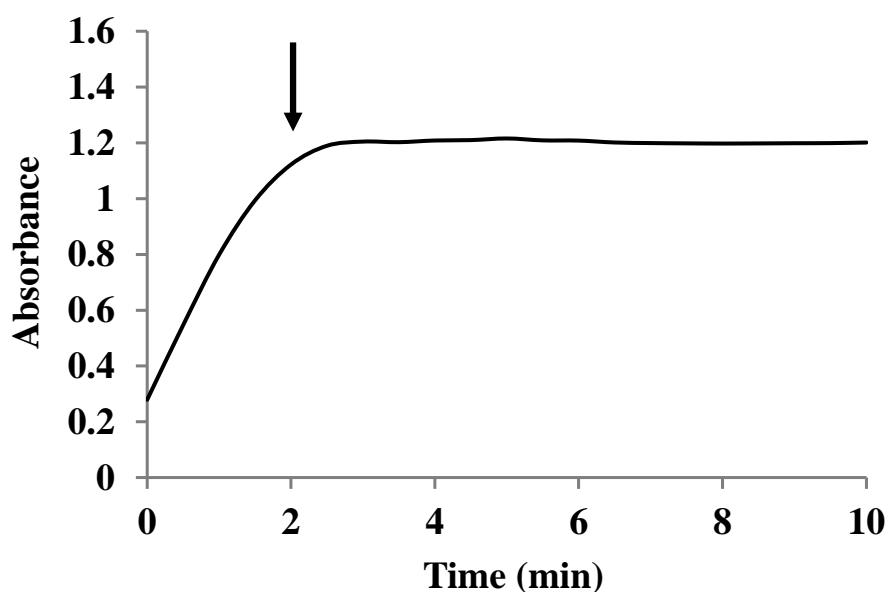


### 2-3. 測定条件の最適化

より高い感度を得る目的で、UQ 標準溶液を用いて反応時間や各種試薬濃度といった測定条件の最適化を行なった。

#### 2-3-1. 反応時間

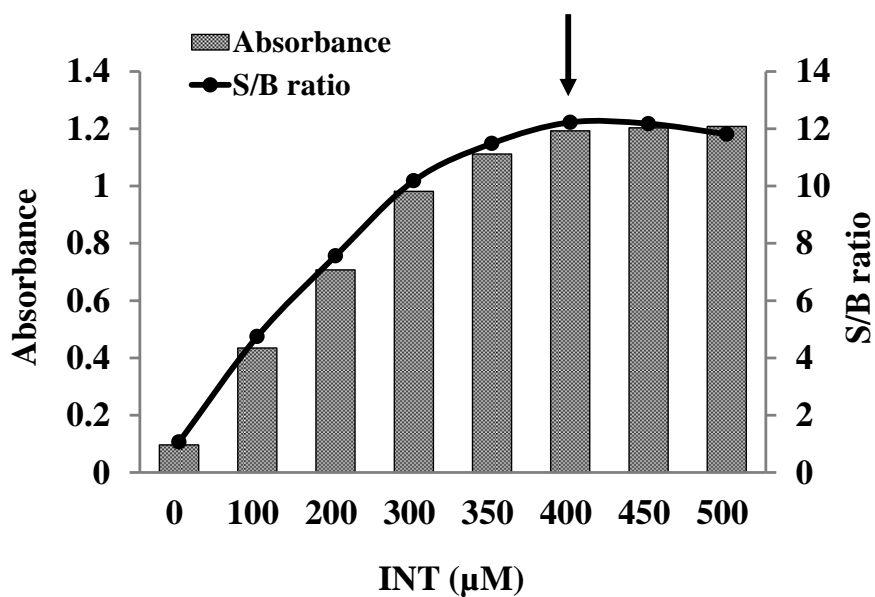
酸化還元発色試薬である INT は、UQ と  $\text{NaBH}_4$  との反応により発生するスーパーオキシドアニオンラジカルと反応し、 $\lambda=510\text{ nm}$  に極大吸収を有するホルマザン色素に変換される。ここでは、最大の吸光度に達するまでの反応時間を調査した。3 液を混合後、プレートリーダー内で 30 秒間攪拌し、時間経過にしたがって増大する吸光度を測定した。その結果、Figure 2-4 に示すように吸光度は攪拌後 2 分で最大に達し、その後 8 分間持続する挙動を示した。したがって、測定までの反応時間として 2 分を選択した。



**Figure 2-4** Time course of color reaction. The concentration of UQ, INT,  $\text{NaBH}_4$  and NaOH were  $1\ \mu\text{M}$ ,  $400\ \mu\text{M}$ ,  $300\ \text{mM}$  and  $7\ \text{mM}$ , respectively.

### 2-3-2. INT 濃度

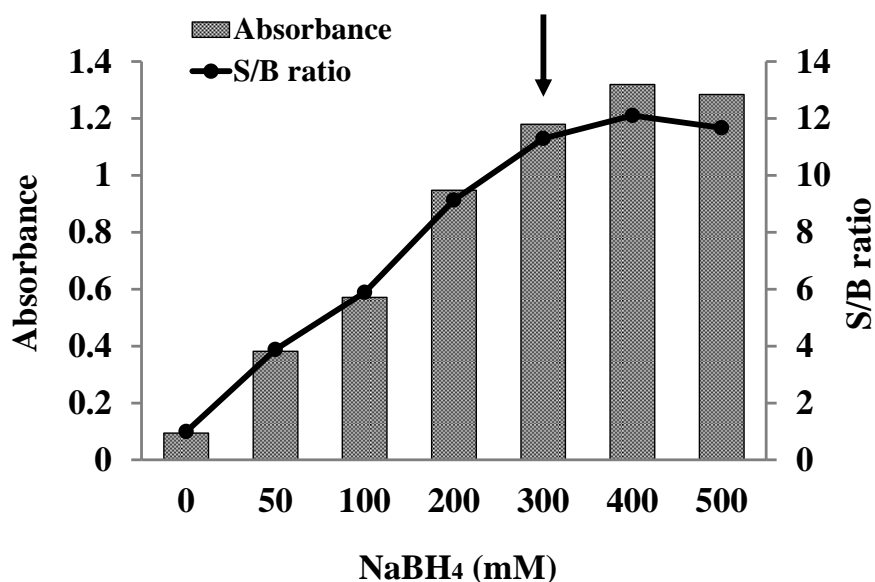
酸化還元発色試薬である INT について 0–500  $\mu\text{M}$  の範囲で濃度の検討を行った。Figure 2-5 に示すように、INT 濃度の増加に伴って吸光度及び S/B 比は増大し、400  $\mu\text{M}$  で最大に達した。したがって、INT の最適濃度として 400  $\mu\text{M}$  を選択した。



**Figure 2-5** Effects of INT concentration on absorbance and S/B ratio. The concentration of UQ,  $\text{NaBH}_4$  and  $\text{NaOH}$  were 1  $\mu\text{M}$ , 300 mM and 7 mM, respectively.

### 2-3-3. NaBH<sub>4</sub> 濃度

還元剤である NaBH<sub>4</sub> について 0–500 μM の範囲で濃度の検討を行なった。Figure 2-6 に示すように、吸光度と S/B 比は NaBH<sub>4</sub> 濃度と共に増加し 400 mM で最大に達した。しかしながら、300 mM 以上の濃度の NaBH<sub>4</sub> を用いた場合、反応溶液中に気泡が発生し、再現性の低下が見られた。これは NaBH<sub>4</sub> の反応から発生する H<sub>2</sub> ガスが原因だと考えられた。以上の結果より、最適な NaBH<sub>4</sub> 濃度として 300 mM を選択した。

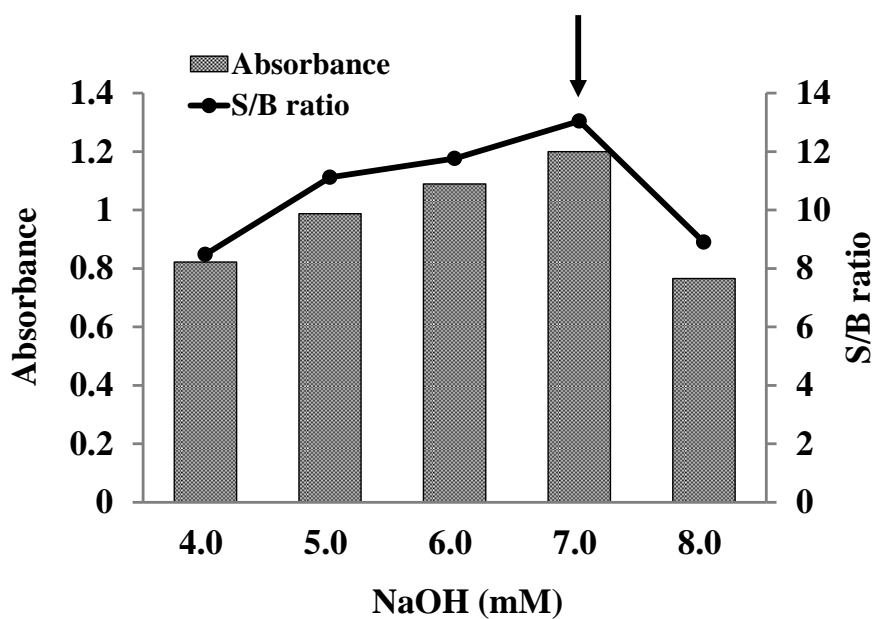


**Figure 2-6** Effects of NaBH<sub>4</sub> concentration on absorbance and S/B ratio. The concentration of UQ, INT and NaOH were 1 μM, 400 μM and 7 mM, respectively.



#### 2-3-4. 水酸化ナトリウム濃度

INT の発色反応は塩基性条件下で進行することが知られている。したがって、INT 及び  $\text{NaBH}_4$  の溶媒として水酸化ナトリウム水溶液を選択し、4.0–8.0 mM の範囲で濃度を検討した。Figure 2-7 に示すように、吸光度及び S/B 比は水酸化ナトリウム濃度が 7.0 mM まで増大していき、その後減少に転じた。したがって、最適な水酸化ナトリウム濃度として 7.0 mM を選択した。



**Figure 2-7** Effects of NaOH concentration on absorbance and S/B ratio. The concentration of UQ, INT and  $\text{NaBH}_4$  were 1  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$  and 300 mM, respectively.

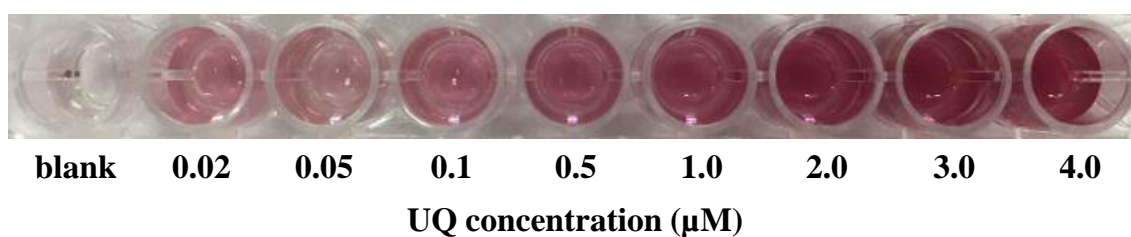
#### 2-4. 検量線及び検出下限

最適条件下において、UQ 標準溶液を用いて検量線を作成した。Table 2-1 に示すように、0.02–4.0  $\mu\text{M}$  の範囲において UQ 濃度と吸光度との間に相関係数  $r = 0.993$  の良好な直線関係が得られた。また、ブランクの吸光度にその標準偏差の 3 倍を加えた吸光度 ( $\text{blank} + 3 \text{ SD}$ ) を与える UQ 濃度を検出下限と定義したとき、その値は 14.8 nM であった。実際に、本反応で生成するホルマザン色素は、Figure 2-8 に示すような桃色を呈し、UQ の濃度に応じて発色が強まる傾向が見られた。

**Table 2-1 Calibration curve and limit of detection for UQ.**

| Linear range ( $\mu\text{M}$ ) | Calibration equation* | Correlation coefficient (r) | LOD (nM) |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------|----------|
| 0.02–4.0                       | $Y = 0.203 X + 0.084$ | 0.993                       | 14.8     |

\*Y = Absorbance, X = Concentration of UQ ( $\mu\text{M}$ )



**Figure 2-8 Color change of reaction mixture obtained with different concentration of UQ.**

本法の感度をこれまでに報告されている UQ 定量法と比較したところ (Table 2-2), 吸光度法<sup>72)</sup>と比べて 20 倍, <sup>1</sup>H NMR<sup>73)</sup>と比べて 600 倍, CL 法<sup>25)</sup>と比べて 3 倍高感度であり, HPLC-UV 法<sup>74)</sup>及び HPLC-ECD 法<sup>75)</sup>に匹敵する感度であった. LC-MS/MS 法<sup>77)</sup>の感度には 2 倍劣る結果となったが, 本法は複雑な前処理や長い反応時間を必要とせず, 簡便な操作で UQ が定量可能である. さらに, 本法はプレートリーダーの使用により多数の試料の一斉測定が可能であり, 迅速性の点でも優れていると考えている.

**Table 2-2 Comparison of the analytical performances of the proposed method to previously reported methods.**

| Method              | Sample   | Measurement time      | linear range<br>( $\mu\text{M}$ ) | LOD<br>(nM) | Ref.           |
|---------------------|--|-----------------------|-----------------------------------|-------------|----------------|
| Spectrophotometry   | Pharmaceutical products/plasma                 | (spectrum scan 0.1 s) | 0.12–5.8                          | 286         | 72             |
| $^1\text{H-NMR}$    | Food supplements                               | 19 min                | 16–2300                           | 9030        | 73             |
| HPLC-UV             | Human plasma                                   | 7 min                 | 0.1–15                            | 20          | 74             |
| HPLC-ECD            | Mouse tissues<br>(liver, heart, muscle, brain) | 16 min                | 0.058–23                          | 17          | 75             |
| HPLC-ECD            | Human plasma                                   | 9 min                 | 0.1–3                             | 2.5         | 76             |
| LC-MS/MS            | Human serum                                    | 5 min                 | 0.0064–0.23                       | 6.4         | 77             |
| CL assay            | Pharmaceutical preparations                    | 30 s                  | 0.3–6.0                           | 50          | 25             |
| Colorimetric method | Cosmetic products                              | 2 min                 | 0.02–4.0                          | 14.8        | This<br>method |

## 2-5. 日内及び日間の再現性

日内及び日間における繰り返し測定の精度を、検量線範囲内における 3 点の濃度で算出した。その結果、日内の精度は RSD 3.3% 以下、日間の精度は RSD 10.6% 以下であった (Table 2-3)。

**Table 2-3 Precision of the proposed colorimetric method.**

| UQ ( $\mu\text{M}$ ) | Precision (%RSD)  |                   |
|----------------------|-------------------|-------------------|
|                      | Intra-day (n = 5) | Inter-day (n = 3) |
| 0.05                 | 3.3               | 10.6              |
| 1.00                 | 1.6               | 8.5               |
| 3.00                 | 3.1               | 1.2               |

## 2-6. 実試料への応用

本法の応用として、UQの配合が明記された市販の化粧水中に含まれるUQの定量を試みた。

### 2-6-1. 添加剤の影響

実試料へと応用する前に、化粧品や医薬品に添加剤として典型的に配合される化合物が本発色反応に与える影響を調査した。各化合物はUQに対して1000倍の濃度となるように反応溶液へ添加し、添加剤存在下での吸光度を測定した (Table 2-4)。その結果、添加剤が共存した場合であってもUQに由来する吸光度に変化は見られなかった。したがって、本法は添加剤による影響を受けることなくUQの選択的な定量が可能であることが示された。

**Table 2-4 Effect of additives on the colorimetric method of UQ.**

| Additive          | Relative absorbance |
|-------------------|---------------------|
| Without additive  | 100.0               |
| KCl               | 100.6               |
| MgCl <sub>2</sub> | 98.3                |
| Alanine           | 101.0               |
| Stearic acid      | 100.7               |
| Lactose           | 100.5               |

## 2-6-2. 化粧品中 UQ の定量

UQ が配合されている市販の化粧水 2 種について、開発した発色定量法を用いてその含有量を測定した。厚生労働省が定めた化粧品基準により、化粧品中の UQ の最大配合量は 0.03% と定められている<sup>79)</sup>。測定の結果、Table 2-5 に示すように、上記の化粧品には上限値まで UQ が含有されていることが確認された。このように、本法は夾雑成分を含む試料中であっても UQ が定量可能であり、UQ 含有製品の品質管理等に有用であると考えられる。

**Table 2-5 UQ in cosmetic products.**

| Cosmetic product     | Measured value (%)<br>Mean $\pm$ SD, n = 5 | Upper limit<br>value (%) |
|----------------------|--|--------------------------|
| Q10 lotion (DHC)     | 0.03 $\pm$ 0.001                           | 0.03                     |
| Q10 water mist (DHC) | 0.03 $\pm$ 0.0004                          | 0.03                     |

## 2-7. 他のキノンへの応用性

本発色反応の原理はキノンの活性酸素発生能に基づいていることから、UQ以外のキノンにも応用可能であると考えられる。そこで、1,2-NQ, 1,4-NQ, 9,10-PQ, PQQ, VK<sub>1</sub> 及び VK<sub>2</sub> について、NaBH<sub>4</sub> 及び INT との反応溶液の吸光度を UQ と同様の手順で測定した。その結果、Figure 2-9 に示すように検討したキノンはいずれも  $\lambda = 510 \text{ nm}$  における吸収を示すことが確認された。今回の検討は UQ に最適化した条件で行なっているため、UQ で最も高い S/B 比が得られたが、各キノンに最適化した条件で測定することにより、高感度な発色定量法の構築が可能であると考えられる。

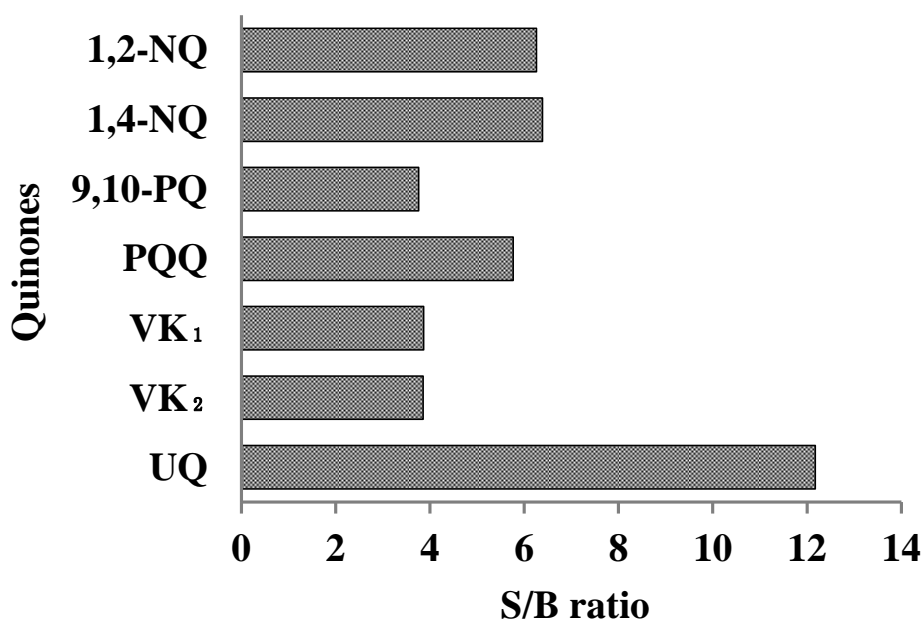


Figure 2-9 S/B ratio of quinones determined by the proposed method.



## 2-8. 小括

キノンの活性酸素発生能を利用する，UQ の簡便かつ高感度な発色定量法を新たに開発した．UQ と還元剤  $\text{NaBH}_4$  の反応により発生したスーパーオキシドアニオンラジカルによって，酸化還元発色試薬である INT は  $\lambda = 510 \text{ nm}$  に吸収極大波長を有するホルマザン色素へと変換される．ホルマザン色素の生成は UQ の濃度に応じて増加することから， $\lambda = 510 \text{ nm}$  の吸光度測定によって UQ の定量が可能となる．このとき，多数の試料の一斉測定を可能とするために，マイクロプレートリーダーを用いて反応溶液の吸光度を測定することにした．

各種測定条件の最適化後，UQ 標準溶液を用いて検量線を作成したところ， $0.02\text{--}4.0 \mu\text{M}$  の範囲において濃度と吸光度との間に良好な直線関係が得られ，検出下限は  $14.8 \text{ nM}$  であった．本法の感度を他法と比較したところ，吸光度法と比べて 20 倍， $^1\text{H NMR}$  法と比べて 600 倍，CL 法と比べて 3 倍高感度であり，HPLC-UV 法及び HPLC-ECD 法に匹敵する感度が得られた．LC-MS/MS 法と比較すると感度はやや劣るものの，本法は複雑な前処理や長い反応時間を必要とせず，UQ の迅速な定量が可能である．

開発した方法を UQ の配合が明記された化粧品へと応用したところ，試料中の UQ を選択的に定量可能であった．以上の結果より，本法は UQ 含有製品の品質管理等に有用であると考えられる．

## 【総括】

本研究では、キノンの酸化還元サイクルを利用する新規キノン定量法の開発とその応用に関する検討を行なった。キノンは還元剤との反応によって不安定なセミキノンラジカルに還元され、これが再酸化される過程において溶存酸素を活性酸素へと変換する性質を有する。このとき発生する活性酸素量はキノン濃度に比例することから、CL 試薬あるいは酸化還元発色試薬を用いて活性酸素を定量することで、間接的にキノンの定量が可能となる。本研究では、生体内で重要な機能を有するキノンである PQQ 及び UQ を測定対象として新規定量法の開発を行なった。さらに、開発した定量法を生体試料や化粧品等の実試料へと応用し、その有用性を評価した。

第一章では、キノンの酸化還元サイクルによって発生するスーパーオキシドアニオンラジカルを CL 試薬であるルミノールを用いて検出するという原理に基づく、PQQ の HPLC-CL 定量法を開発した。カラム通過後の PQQ にオンラインで還元剤 DTT 及びルミノールを混合し、反応コイルを通過させた後に CL 検出器へと導入することで、PQQ の検出を行なった。反応条件の最適化後、生体試料への応用を目的とする PQQ の新規 SPE 法に関する検討を行なった。前処理操作を確立後、血漿における添加検量線を作成したところ、4-400 nmol/L plasma の範囲において血漿中 PQQ 濃度とピーク面積の間に良好な直線関係が得られた。検出下限は 1.08 nmol/L plasma であり、同様に生体試料を対象とした GC-MS 法と比較して 5 倍高感度であった。さらに、本法を PQQ サプリメントを服用した健康人被験者から経時的に採取した血漿試料へと応用し、ヒト血中 PQQ 濃度の変化を調査した。その結果、サプリメントの服用により血中の PQQ 濃度が上昇することが確認された。さらに、サプリメントを一週間連続服用した後では、単回服用時と比較して PQQ の血中濃度が高い値を維持する傾向にあった。これらの結果から、本法は PQQ の血中濃度モニタリングに有用であることが示された。

第二章では、キノンの酸化還元サイクルに基づく反応の新たな展開として、CL 試薬に代わり、酸化還元発色試薬である INT を用いた UQ の定量法を開発した。本法は、キノンの酸化還元サイクルによって発生するスーパーオキシドアニオンラジカルと INT を反応させ、生成するホルマジン色素の吸光度を測定することにより、UQ の定量を行なう方法である。UQ に INT 及び還元剤  $\text{NABH}_4$  を混合したところ、 $\lambda = 510 \text{ nm}$  にホルマジン色素の生成に伴う UV 吸収が確認され

た。また、その吸光度はUQの濃度に応じて増加したことから、UQの定量が可能であった。測定条件の最適化後、UQ標準溶液を用いて検量線を作成したところ、0.02–4.0  $\mu\text{M}$  の範囲において直線関係が得られ、検出下限は14.8 nMであった。本法とこれまでに報告されている他法との感度を比較したところ、HPLC-UV法及びHPLC-ECD法に匹敵する感度が得られた。さらに、本法は測定にマイクロプレートリーダーを使用することで、一度に多量の試料を迅速に測定可能という利点を有する。最後に、本法をUQが配合されている化粧品へ応用したところ、試料中UQを選択的に定量可能であった。これらの結果より、本法はUQ含有製品の品質管理等において実用的な手法になりうると考えられる。

以上のように、本研究ではキノンの酸化還元サイクルに基づく新たな定量法を確立することができた。還元剤との反応により活性酸素を発生するというキノンに特異的な反応を利用することで、医薬品や生体試料等の様々な共存成分を含む試料中であっても、キノンを選択的かつ高感度に定量可能であることが明らかにされた。本法は生体や環境中におけるキノンの挙動解析から、品質管理等の日常的な分析法としても有用な手段であると考えている。

## 【実験の部】

### 各章に共通の事項

#### (1) 水

蒸留水を純水製造装置 Yamato Autostill WG 220 (ヤマト科学) に通して得た精製水を使用した。

#### (2) 洗浄

ガラス器具は中性洗剤で超音波洗浄後、蒸留水で洗浄し、乾燥後に使用した。

#### (3) 試薬

- ・水酸化ナトリウム (メルク)
- ・HPLC 用メタノール (関東化学)
- ・HPLC 用アセトニトリル (関東化学)
- ・ピロロキノリンキノン二ナトリウム塩 (関東化学)

### 第一章に関する事項

#### (1) 試薬

- ・臭化テトラブチルアンモニウム (東京化成工業)
- ・トリスヒドロキシメチルアミノメタン (MP バイオメディカルズ)
- ・硝酸 (関東化学)
- ・ルミノール (和光純薬工業)
- ・ジチオスレイトール (ナカライテスク)
- ・リン酸二水素ナトリウム (和光純薬工業)
- ・塩酸 (ナカライテスク)
- ・ピリジン (キシダ化学)

#### (2) 試薬溶液

- ・PQQ 標準溶液: 精製水に溶解し、目的濃度に応じて移動相で希釈した。
- ・移動相: 4 mM 臭化テトラブチルアンモニウムを含む 50 mM トリス-硝酸緩衝液 (pH 8.8) とアセトニトリルを 7/3 (v/v) で用事調製した。

- ・ルミノール溶液: 150 mM 水酸化ナトリウム水溶液で溶解し, 1.5 mM とした.
- ・DTT 溶液: アセトニトリルで溶解し, 0.15 mM とした.

### (3) 緩衝液

50 mM トリシュー硝酸緩衝液 (pH 8.8) は, トリスヒドロキシメチルアミノメタン 3.03 g を 500 mL の精製水に溶解後, 硝酸を加えて pH 8.8 に調整した.

### (4) 使用機器等

- ・HPLC ポンプ: LC-20AD, LC-20AT (島津製作所)
- ・マニュアルインジェクター: Rheodyne 7125 (loop 20  $\mu$ L, レオダイン)
- ・HPLC ガードカラム: InertSustain C18 Guard Column E (10  $\times$  4.0 mm i.d., 3  $\mu$ m, ジーエルサイエンス)
- ・HPLC カラム: InertSustain C18 (150  $\times$  4.6 mm i.d., 3  $\mu$ m, ジーエルサイエンス)
- ・化学発光検出器: CLD-10A (島津製作所)
- ・記録計: EZChrom Elite (アジレント)
- ・PTFE チューブ (7 m  $\times$  0.5 mm i.d., ジーエルサイエンス)
- ・pH メーター: pH METER F-22 (堀場製作所)
- ・真空採血管: ベノジェクト II 真空採血管 (テルモ)
- ・遠心分離機: himac CF-7D2 (日立製作所)

### (5) 固相抽出カートリッジ

- ・BOND ELUT-C18, 500 mg/3 mL (アジレント)

### (6) 血漿試料

- ・プール血漿: EDTA 処理正常ヒトプール血漿 (コージンバイオ)

### (7) PQQ サプリメント

三菱瓦斯化学株式会社より提供を受けた. カプセルはセルロース製で, 内容物は BioPQQ (10 mg), デンプン (150.5 mg), デンプン加水分解物 (82 mg), ステアリン酸カルシウム (7.5 mg) である. 日本薬局方一般試験法に基づく崩壊試験及び溶出試験によって確認されている.

## (8) PQQ サプリメント服用血漿

実験の趣旨を説明し、同意を得られた健常人被験者 6 名 (男性 2 人, 女性 4 人, 平均年齢  $25.8 \pm 7.0$  歳) より血液の提供を受けた. サプリメントは 1 日 1 回, 10 錠 (総 PQQ 100 mg) を服用した. EDTA を含む真空採血管で採血後, 氷上で保存し, 直ちに 3000 rpm,  $5^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心分離を行なった. 上澄みを回収し, 測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した.

## 第二章に関する事項

### (1) 試薬

- ・ユビキノン (和光純薬工業)
- ・ヨードニトロテトラゾリウムクロリド (和光純薬工業)
- ・水素化ホウ素ナトリウム (和光純薬工業)
- ・1,2-ナフトキノン (東京化成工業)
- ・1,4-ナフトキノン (ナカライテスク)
- ・9,10-フェナンスレンキノン (東京化成工業)
- ・ビタミン  $\text{K}_1$  (ナカライテスク)
- ・ビタミン  $\text{K}_2$  (シグマアルドリッチ)

### (2) 試薬溶液

- ・UQ 標準溶液: メタノール/アセトニトリル (8/2, v/v) 溶液に溶解し, 目的濃度に応じて同液で希釈した.
- ・INT 溶液: 7 mM 水酸化ナトリウム水溶液で用事調製した.
- ・ $\text{NaBH}_4$  溶液: 7 mM 水酸化ナトリウム水溶液で用事調製した.

### (3) 使用機器等

- ・マイクロプレートリーダー: SpectraMax M5 (Molecular Device)
- ・平底 96 穴マイクロプレート: CELLSTAR® 96 well cell culture plate, sterile, F-bottom, with lid (Greiner Bio-one)

(4) 添加剤

KCl, MgCl<sub>2</sub>, アラニン及びラクトースは水に, ステアリン酸はエタノールにそれぞれ溶解し, 濃度はすべて 1 mM とした.

(5) 化粧品試料

Q10 lotion (DHC) 及び Q10 water mist (DHC) をメタノール/アセトニトリル (8/2, v/v) 溶液で 300 倍に希釈した後, 2-2 に示す手順に沿って測定した.

(6) キノン溶液

PQQ は水に, 1,2-NQ, 1,4-NQ, 9,10-PQ, VK<sub>1</sub> 及び VK<sub>2</sub> はエタノールにそれぞれ溶解した後, メタノール/アセトニトリル (8/2, v/v) 溶液で希釈し, 1 μM とした.

## 【謝辞】

本研究を通じて、御懇意なる御指導と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薬品分析化学研究室、黒田直敬教授に謹んで感謝致します。

本論文の作成にあたり、貴重な御助言並びに御校閲を賜りました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬剤学研究室、西田孝洋教授、並びに長崎大学大学院医歯薬学総合研究科機能性分子化学研究室、山吉麻子教授に深く感謝致します。

本研究の遂行及び本論文の作成にあたり、多大なる御助言並びに御指導頂きました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、岸川直哉准教授に心から感謝致します。

本研究の遂行にあたり、御助言並びに御指導頂きました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科実践薬学研究室、大山要准教授に心より御礼申し上げます。

本研究において、試料を提供して頂くとともに、有益な御助言を頂きました三菱瓦斯化学株式会社、池本一人博士に厚く御礼申し上げます。

本研究において、貴重な御意見を頂きました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、Mahmoud Hamed El-Maghrabey 博士、並びに修了生、卒業生、研究室生の皆様に感謝の意を表します。

最後になりましたが、本研究及びこれまでの学生生活において、多大なる御支援、御協力を頂きました皆様に深く感謝致します。ありがとうございました。

2020年3月



## 【参考文献】

- 1) Crane F. L., Hatefi Y., Lester R. L., Widmer C., *Biochimica et Biophysica Acta*, **25**, 220–221 (1957).
- 2) Crane F. L., *Mitochondrion*, **7S**, 2–7 (2007).
- 3) Salisbury S. A., Forrest H. S., Cruse W. B. T., Kennard O., *Nature*, **280**, 843–844 (1979).
- 4) Hauschka P. V., Lian J. B., Gallop P. M., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **72**, 3925–3929 (1975).
- 5) Shearer M. J., *The Lancet*, **345**, 229–234 (1995).
- 6) Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L., *Pharmacological Reviews*, **56**, 185–229 (2004).
- 7) Cushion M. T., Collins M., Hazra B., Kaneshiro E. S., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 713–719 (2000).
- 8) Angelini L. G., Pistelli L., Belloni P., Bertoli A., Panconesi S., *Industrial Crops and Products*, **6**, 303–311 (1997).
- 9) Šturdík E., Drobnička L., *Chemico-Biological Interactions*, **30**, 105–114 (1980).
- 10) Walgraeve C., Demeestere K., Dewulf J., Zimmermann R., Van Langenhove H., *Atmospheric Environment*, **44**, 1831–1846 (2010).
- 11) Kishikawa N., Nakashima H., Ohyama K., Nakashima K., Kuroda N., *Talanta*, **81**, 1852–1855 (2010).
- 12) Delgado-Saborit J. M., Alam M. S., Godri Pollitt K. J., Stark C., Harrison R. M., *Atmospheric Environment*, **77**, 974–982 (2013).
- 13) Stack D. E., Byun J., Gross M. L., Rogan E. G., Cavalieri E. L., *Chemical Research in Toxicology*, **9**, 851–859 (1996).
- 14) Yager J. D., Davidson N. E., *The New England Journal of Medicine*, **354**, 270–282 (2006).
- 15) Spencer J. P. E., Jenner P., Daniel S. E., Lees A. J., Marsden D. C., Halliwell B., *Journal of Neurochemistry*, **71**, 2112–2122 (1998).
- 16) Kuhn D. M., Arthur R. E. Jr., Thomas D. M., Elferink L. A., *Journal of Neurochemistry*, **73**, 1309–1317 (1999).
- 17) Nelson S. D., Pearson P. G., *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **30**, 169–195 (1990).

- 18) Motoyama Y., Bekki K., Chung S.W., Tang N., Kameda T., Toriba A., Taguchi K., Hayakawa K., *Journal of Health Science*, **55**, 845–850 (2009).
- 19) Kishikawa N., Wada M., Ohba Y., Nakashima K., Kuroda N., *Journal of Chromatography A*, **1057**, 83–88 (2004).
- 20) Kishikawa N., Nakao M., Ohba Y., Nakashima K., Kuroda N., *Chemosphere*, **64**, 834–838 (2006).
- 21) Ahmed S., Fujii S., Kishikawa N., Ohba Y., Nakashima K., Kuroda N., *Journal of Chromatography A*, **1133**, 76–82 (2006).
- 22) Ahmed S., Kishikawa N., Nakashima K., Kuroda N., *Analytica Chimica Acta*, **591**, 148–154 (2007).
- 23) Ahmed S., Kishikawa N., Ohyama K., Wada M., Nakashima K., Kuroda N., *Talanta*, **78**, 94–100 (2009).
- 24) Ahmed S., Kishikawa N., Ohyama K., Maki T., Kurosaki H., Nakashima K., Kuroda N., *Journal of Chromatography A*, **1216**, 3977–3984 (2009).
- 25) Kishikawa N., Ohkubo N., Ohyama K., Nakashima K., Kuroda N., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **393**, 1337–1343 (2009).
- 26) Kishikawa N., Ohkubo N., Ohyama K., Nakashima K., Kuroda N., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **400**, 381–385 (2011).
- 27) Elgawish M. S., Shimomai C., Kishikawa N., Ohyama K., Wada M., Kuroda N., *Chemical Research in Toxicology*, **26**, 1409–1417 (2013).
- 28) Killgore J., Smidt C., Duich L., Romero-chapman N., Tinker D., Reiser K., Melko M., Hyde D., Rucker R. B., *Science*, **245**, 850–852 (1989).
- 29) Kasahara T., Kato T., *Nature*, **422**, 832 (2003).
- 30) Kumazawa T., Seno H., Urakami T., Matsumoto T., Suzuki O., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1156**, 62–66 (1992).
- 31) Mitchell A. E., Jones A. D., Mercer R. S., Rucker R. B., *Analytical Biochemistry*, **269**, 317–325 (1999).
- 32) Tsuchida T., Yasuyama T., Higuchi K., Watanabe A., Urakami T., Akaike T., Sato K., Maeda H., *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **8**, 342–347 (1993).
- 33) Xu F., Mack C. P., Quandt K. S., Shlafer M., Massey V., Hultquist D. E., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **193**, 434–439 (1993).

- 34) Jensen F. E., Gardner G. J., Williams A. P., Gallop P. M., Aizenman E., Rosenberg P. A., *Neuroscience*, **62**, 399–406 (1994).
- 35) Naito Y., Kumazawa T., Kino I., Suzuki O., *Life Sciences*, **52**, 1909–1915 (1993).
- 36) Yamaguchi K., Sasano A., Urakami T., Tsuji T., Kondo K., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **57**, 1231–1233 (1993).
- 37) Hamagishi Y., Murata S., Kamei H., Oki T., Adachi O., Ameyama M., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **255**, 980–985 (1990).
- 38) Scanlon J. M., Aizenman E., Reynolds I. J., *European Journal of Pharmacology*, **326**, 67–74 (1997).
- 39) Nishigori H., Yasunaga M., Mizumura M., Lee J. W., Iwatsuru M., *Life Sciences*, **45**, 593–598 (1989).
- 40) Ohwada K., Takeda H., Yamazaki M., Isogai H., Nakano M., Shimomura M., Fukui K., Urano S., *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **42**, 29–34 (2008).
- 41) Kim J., Harada R., Kobayashi M., Kobayashi N., Sode K., *Molecular Neurodegeneration*, **5** (2010).
- 42) Kobayashi M., Kim J., Kobayashi N., Han S., Nakamura C., Ikebukuro K., Sode K., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **349**, 1139–1144 (2006).
- 43) Smith A. R., Kirchhoff J. R., Zhang Z., Tillekeratne L. M. V., Hudson R. A., *Journal of Chromatography A*, **876**, 193–199 (2000).
- 44) Bergethon P. R., *Analytical Biochemistry*, **186**, 324–327 (1990).
- 45) Zhang Z., Tillekeratne L. M. V., Kirchhoff J. R., Hudson R. A., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **212**, 41–47 (1995).
- 46) Noji N., Nakamura T., Kitahata N., Taguchi K., Kudo T., Yoshida S., Tsujimoto M., Sugiyama T., Asami T., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 7258–7263 (2007).
- 47) Kumazawa T., Sato K., Seno H., Ishii A., Suzuki O., *Biochemical Journal*, **307**, 331–333 (1995).
- 48) Zhou X., Qin X., Cao G., Zhang J., *Chromatographia*, **75**, 521–526 (2012).
- 49) Glatz Z., Moravcová M., Janiczek O., *Journal of Chromatography B*, **739**, 101–107 (2000).

- 50) Buffoni F., Cambi S., Moneti G., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1116**, 297–304 (1992).
- 51) Harris C. B., Chowanadisai W., Mishchuk D. O., Satre M. A., Slupsky C. M., Rucker R. B., *Journal of Nutritional Biochemistry*, **24**, 2076–2084 (2013).
- 52) Suzuki O., Kumazawa T., Seno H., Urakami T., Matsumoto T., *Life Sciences*, **47**, 2135–2141 (1990).
- 53) van der Meer R. A., Groen B. W., van Kleef M. A. G., Frank J., Jongejan J. A., Duine J. A., *Methods in Enzymology*, **188**, 260–283 (1990).
- 54) “最新固相抽出ハンドブック”, ジーエルサイエンス, 30–34 (1996).
- 55) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), and Center for Veterinary Medicine (CVM), “Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation.” <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>>, cited 27 February, 2017.
- 56) Itoh Y., Hine K., Miura H., Uetake T., Nakano M., Takemura N., Sakatani K., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **876**, 319–325 (2016).
- 57) Mohr D., Umeda Y., Redgrave T. G., Stocker R., *Redox Report*, **4**, 79–87 (1999).
- 58) Okamoto T., Matsuya T., Fukunaga Y., Kishi T., Yamagami T., *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **59**, 288–292 (1989).
- 59) Aberg F., Appelkvist E. L., Dallner G., Ernster L., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **295**, 230–234 (1992).
- 60) Kalén A., Appelkvist E. L., Dallner G., *Lipids*, **24**, 579–584 (1989).
- 61) Lim S. C., Lekshminarayanan R., Goh S. K., Ong Y. Y., Subramaniam T., Sum C. F., Ong C. N., Lee B. L., *Atherosclerosis*, **196**, 966–969 (2008).
- 62) Wada H., Goto H., Hagiwara S., Yamamoto Y., *Journal of the American Geriatrics Society*, **55**, 1141–1142 (2007).
- 63) Momomura S., Serizawa T., Ohtani Y., Iizuka M., Sugimoto T., *Japanese Heart Journal*, **32**, 101–110 (1991).
- 64) Lei L., Liu Y., *BMC Cardiovascular Disorders*, **17** (2017)
- 65) Khatta M., Alexander B. S., Krichten C. M., Fisher M. L., Freudenberger R., Robinson S. W., Gottlieb S. S., *Annals of internal medicine*, **132**, 636–640 (2000).

- 66) Rosenfeldt F. L., Haas S. J., Krum H., Hadj A., Ng K., Leong J-Y., Watts G. F., *Journal of human hypertension*, **21**, 297–306 (2007).
- 67) Hodgson J. M., Watts G. F, Playford D. A., Burke V., Croft K. D., *European Journal of Clinical Nutrition*, **56**, 1137–1142 (2002).
- 68) Mezawa M., Takemoto M., Onishi S., Ishibashi R., Ishikawa T., Yamaga M., Fujimoto M., Okabe E., He P., Kobayashi K., Yokote K., *Biofactors*, **38**, 416–421 (2012).
- 69) Yoritaka A., Kawajiri S., Yamamoto Y., Nakahara T., Ando M., Hashimoto K., Nagase M., Saito Y., Hattori N., *Parkinsonism and Related Disorders*, **21**, 911–916 (2015).
- 70) Fan L., Feng Y., Chen G-C., Qin L-Q., Fu C-L., Chen L-H., *Pharmacological Research*, **119**, 128–136 (2017).
- 71) Navas P., Villalba J. M., de Cabo R., *Mitochondrion*, **7S**, 34–40 (2007).
- 72) Karpilska J., Frankowska R., *Instrumentation Science & Technology*, **32**, 281–290 (2004).
- 73) Monakhova Y. B., Ruge I., Kuballa T., Lerch C., Lachenmeier D. W., *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **83**, 67–72 (2013).
- 74) Contin M., Lucangioli S., Martinefski M., Flor S., Tripodi V., *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **34**, 2485–2494 (2011).
- 75) Tang P. H., Miles M. V., Miles L., Quinlan J., Wong B., Wenisch A., Bove K., *Clinica Chimica Acta*, **341**, 173–184 (2004).
- 76) Wang Q., Lee B. L., Ong C. N., *Journal of Chromatography B*, **726**, 297–302 (1999).
- 77) Ruiz-Jiménez J., Priego-Capote F., Mata-Granados J. M., Quesada J. M., Luque de Castro M. D., *Journal of Chromatography A*, **1175**, 242–248 (2007).
- 78) Podczasy J. J., Wei R., *Biochemical and biophysical research communications*, **150**, 1294–1301 (1988).
- 79) Ministry of Health, Labour and Welfare. “Standards for Cosmetics.”: <<https://www.mhlw.go.jp/english/dl/cosmetics.pdf>>, cited 12 June, 2019.