

エキシマー蛍光誘導体化法による生体関連物質の分析

吉田 秀幸

**Analyses of Biogenic Related Compounds Based on Intramolecular
Excimer-forming Fluorescence Derivatization**

Hideyuki YOSHIDA

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, 8-19-1, Nanakuma,
Johanan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan*

(Received May 7, 2003)

A highly selective and sensitive method based on a novel concept is introduced for the assay of biological substances. This method is based on an intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization with a pyrene reagent, followed by reverse-phase HPLC. Polyamines, polyphenols, and dicarboxylic acids, which have two or more reactive functional groups in a molecule, were converted to the corresponding polypyrene-labeled derivatives by reaction with the appropriate pyrene reagent. The derivatives exhibited intramolecular excimer fluorescence (440—520 nm), which can clearly be discriminated from the monomer (normal) fluorescence (360—420 nm) emitted by pyrene reagents and monopyrene-labeled derivatives of monofunctional compounds. With excimer fluorescence detection, highly selective and sensitive determination of polyamines, polyphenols, and dicarboxylic acids can be achieved. Furthermore, the methods were successfully applied to the determination of various biological and environmental substances in real samples, which require only a small amount of sample and simple pretreatment.

Key words—excimer fluorescence; HPLC; derivatization; pyrene reagent; pretreatment

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、近年、医療、環境、食品などの分野で使用されている。HPLC の検出は測定対象物質の物理的・化学的性質を検知することに基づいており、吸光度、電気化学、質量分析、蛍光などの検出器が用いられている。しかしながら、これら検出法に対し、目的成分が必ずしも強い応答を示すとは限らず、全く応答を示さないこともある。

誘導体化の大きな目的の1つは、検出器に対し目的物質が十分な応答を示さないときに、化学反応などにより検出器に強い応答を示す物質へ変換することであり、使用される試薬は誘導体化 (ラベル化、標識) 試薬と呼ばれる。各種検出器に反応する誘導体化法が開発されているが、その中で蛍光誘導体化

法が汎用され、そのために必要な試薬類も数多く開発されている。

ほとんどの蛍光誘導体化試薬には、目的物質を標識するための反応部位と発蛍光に関与する蛍光部位が同一分子内に共存している。多くの蛍光団が開発されているが、¹⁻³⁾ これらの蛍光性試薬を用いて実試料中の微量成分を分析するとき、多種多量に存在する共存物質や誘導体化反応の際に過剰に加えられた蛍光性の試薬が測定対象物質の分析を妨げる要因となることがある。そこでそれらの問題点を解決するために、無蛍光性の試薬を用いる発蛍光誘導体化法の開発や特殊な蛍光現象 (蛍光偏光、時間分解蛍光、蛍光共鳴エネルギー移動など) を導入した誘導体化法の開発が試みられている。本稿では、筆者らの開発した「エキシマー蛍光誘導体化法」の概念及び同誘導体化法による生体関連物質の分析について、これまで得られた知見を紹介する。

2. エキシマー蛍光誘導体化

ピレンなどの多環芳香族蛍光分子が互いに近接するとき、基底状態では安定な2量体を作らないが、

福岡大学薬学部 (〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1)

e-mail: hyoshida@fukuoka-u.ac.jp

*本総説は、平成14年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

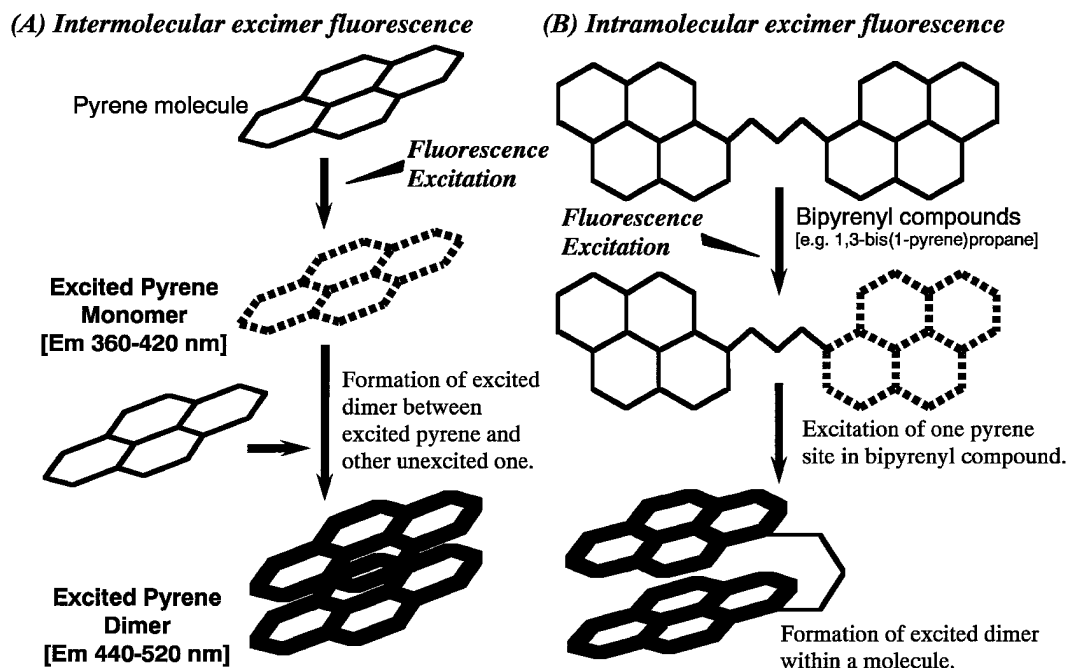


Fig. 1. Schematic Diagrams of the Production of (A) Intermolecular and (B) Intramolecular Excimer Fluorescence of Pyrene

(A) The excited-state pyrene molecule can reorient to form the excimer with other ground-state pyrene molecule in high concentrated pyrene solution. (B) 1,3-Bis(1-pyrene)propane molecule can form the excimer within a molecule, even if in the extremely diluted solution.

1つの分子が励起光を吸収して励起状態となると、他の基底状態の分子と会合して励起2量体 (excited dimer, エキシマー) を形成する。このエキシマーからの発光をエキシマー蛍光という (Fig. 1)。エキシマー蛍光は2個の蛍光分子間で生じる分子間エキシマー蛍光と同一分子内に存在する2ヵ所の蛍光団の間で生じる分子内エキシマー蛍光があり、前者が高濃度でしか観測されないのに対し、後者は低濃度でも観測される。ピレンの場合、モノマーからの通常蛍光は375 nm付近に蛍光極大があるが、エキシマー蛍光の極大波長は475 nm付近へ長波長シフトする。⁴⁻⁶⁾

このエキシマー蛍光現象を誘導体化に導入することで、従来の蛍光誘導体化法では困難であった対象物質1分子あたり1個の蛍光団が導入された誘導体と複数個導入された誘導体とを分光学的に識別できると考え、エキシマー蛍光誘導体化法の開発を行った (Fig. 2)。この方法では、複数反応部位を有する測定対象物に複数のピレン構造を導入し、そこからのエキシマー蛍光を検出することで、反応液中に過剰に存在する試薬自身や試料中に共存する単一反応部位のみ有する測定妨害物質の影響を受けずに、目的化合物の選択的分析が可能となる。これに基づ

いて、いくつかの生体関連化合物を簡便、高感度かつ高選択的に分析する方法論を開発した。

3. アミン分析

アミン及びアミノ酸関連化合物は生体中に数多く存在し、多様な役割を果たしている。多くの生体アミンはアミノ基を1ヵ所のみ有するモノアミンであるが、複数のアミノ基を有する化合物群もまた生体中の極めて重要な機能を担っている。それらポリアミン類を従来の蛍光誘導体化法で分析すると、アミノ酸を含む生体中の多くのモノアミンも同時に誘導体化されてポリアミン類と同様の蛍光を与える。したがって、ポリアミン類の分離・定量のためには、試料の煩雑な前処理と高い分解能を持つ分離手段が不可欠であった。そこでポリアミン分析に4-(1-Pyrene)butyric acid *N*-hydroxysuccinimidyl ester (PSE)あるいは4-(1-Pyrene)butyryl chloride (PBC)を用いるエキシマー蛍光誘導体化法を導入し、簡便かつ高選択的な分析法の開発を行った。

3-1. ポリアミン⁷⁻¹⁰⁾ 生体中のポリアミン (プトレシン, スペルミジン及びスペルミン) 及びその誘導体は、癌などの腫瘍診断における指標の1つとされているので、それらのエキシマー蛍光誘導体化-HPLC分析を試みた。

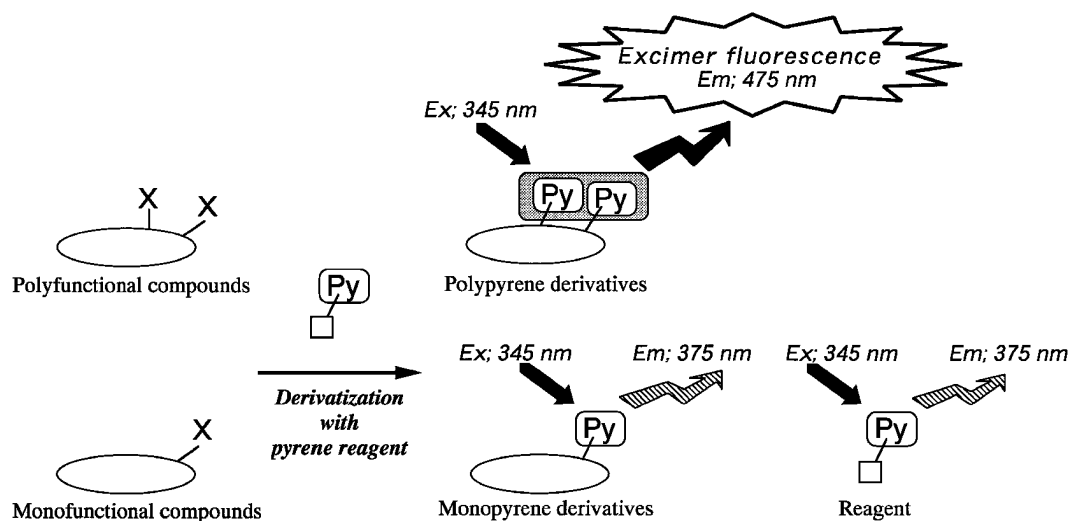


Fig. 2. General Concept of Intramolecular Excimer-forming Fluorescence Derivatization with Pyrene Reagent

By derivatization with pyrene reagent, the polyfunctional compounds can emit the intramolecular excimer fluorescence. On the other hand, the monofunctional compounds coexisted in sample matrix can emit only pyrene monomer fluorescence even if the monofunctional compounds are also derivatized with pyrene reagent.

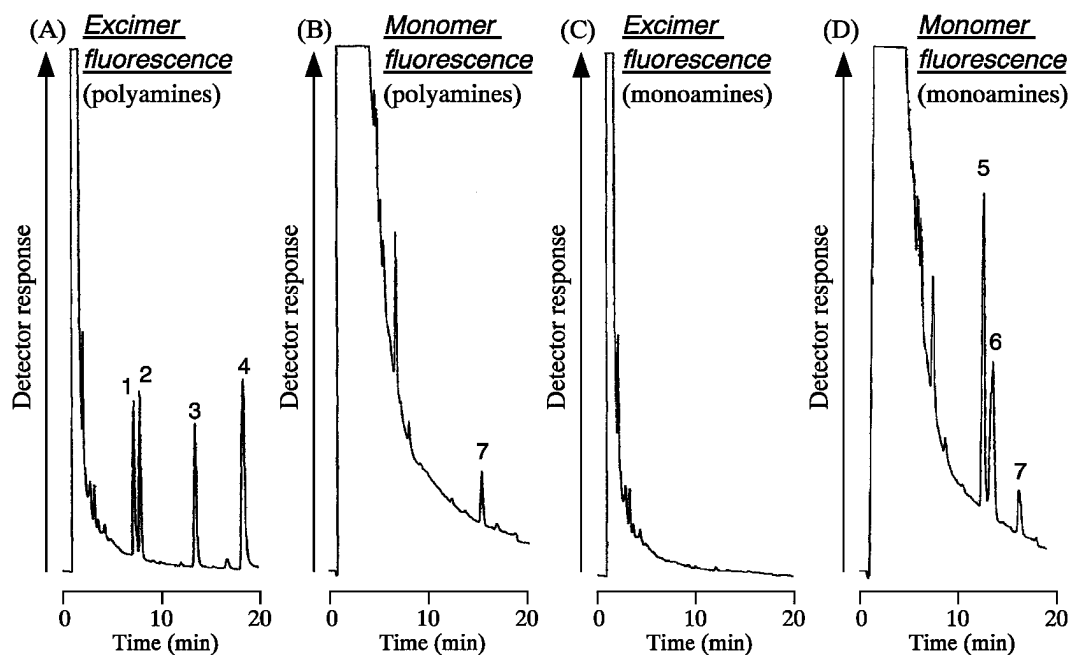


Fig. 3. Chromatograms Obtained with Standard Solutions of (A and B) Polyamines and (C and D) Monoamines by PBC Method

Detections (Ex/Em, nm), (A) and (C): excimer fluorescence (345/475), (B) and (D): monomer fluorescence (345/375). Peaks and amounts (pmol on column), 1: putrescine (5), 2: cadaverine (5), 3: spermidine (5), 4: spermine (10), 5: di-*n*-pentylamine (10), 6: *n*-decylamine (10), 7: PBC, others: reagent blanks.

ポリアミンに PSE あるいは PBC での誘導体化反応を行い、その反応液について逆相 HPLC で分析したところ、エキシマー蛍光検出したときのみピークが確認され (Fig. 3A)、モノマー蛍光検出ではポリアミンのピークは見られなかった (Fig. 3B)。一方、同一条件でモノアミンを分析すると、モノマー蛍光領域でのみピークを与え (Fig. 3D)、エキシ

マー蛍光領域には検出されなかった (Fig. 3C)。試薬ピークはエキシマー蛍光検出を行うことで比較的小さくなった。つまり、エキシマー蛍光検出を行うことで、モノアミンや試薬ブランクの妨害を受けずにポリアミンを選択的に分析することが可能であった。^{7,8)} このように、エキシマー蛍光検出の高選択性に加えて、本法はオンカラムで fmol レベルのポリ

アミン検出を可能とする高感度性も有しているので、従来法より簡便な前処理で微量な生体試料中ポリアミンの定量に適用できる。ヒト尿は水での希釈、血漿は有機溶媒での除タンパクという簡便な前処理操作との組合せにより、生体試料中ポリアミンが定量された。⁹⁾ 一方、Paproskiらにより上記反応試料をミセル導電クロマトグラフィーで分離した後、レーザー誘起蛍光検出する試みも行われている。¹⁰⁾

3-2. その他の化合物¹¹⁻¹⁵⁾ エキシマー蛍光誘導体化法のアミノ酸関連化合物に対する適用例として、シスチン尿症や高リジン血症患者において尿中、血中濃度が高値を示すオルニチン及びリジンの分析、¹¹⁾ アレルギー疾患や潰瘍発症に関わるケミカルメディエーターであるヒスタミンの分析^{12,13)} について研究が行われ、いずれも尿 1 μ l 中でのそれら化合物が分析された。

さらに同誘導体化法の医薬品分析への適用が検討され、トリエンチン¹⁴⁾ やエタンブトール¹⁵⁾ の高選択的分析が達成された。

4. フェノール分析

フェノール性水酸基は前述の PBC でピレン標識が可能なので、フェノール化合物のエキシマー蛍光誘導体化分析について検討を行った。

4-1. ビスフェノール^{16,17)} 環境ホルモンとの疑いが指摘されているビスフェノール A は、ポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂の原料として用いられている。そのため、各種樹脂製品からのビスフェノール A の溶出が問題となっており、特に乳幼児に対する影響が懸念されている。そこで、エキシマー蛍光誘導体化によるビスフェノール A 分析法を開発し、ポリカーボネート製ほ乳びん溶出液中のビスフェノール A の定量を行った。ほ乳びん溶出液からフェノール成分を固相抽出した後、誘導体化-HPLC 分析したところ、未使用未洗浄のほ乳びんから極微量のビスフェノール A の溶出が確認された (Fig. 4A) が、ガラス製ほ乳びんからはビスフェノール A の溶出は全く見られなかった (Fig. 4B)。

4-2. その他の化合物 エキシマー蛍光誘導体化法のフェノール関連化合物に対する適用例として、現在、カテキン類分析への適用について検討を行っている。

一方 PBC は、フェノール性水酸基だけでなくア

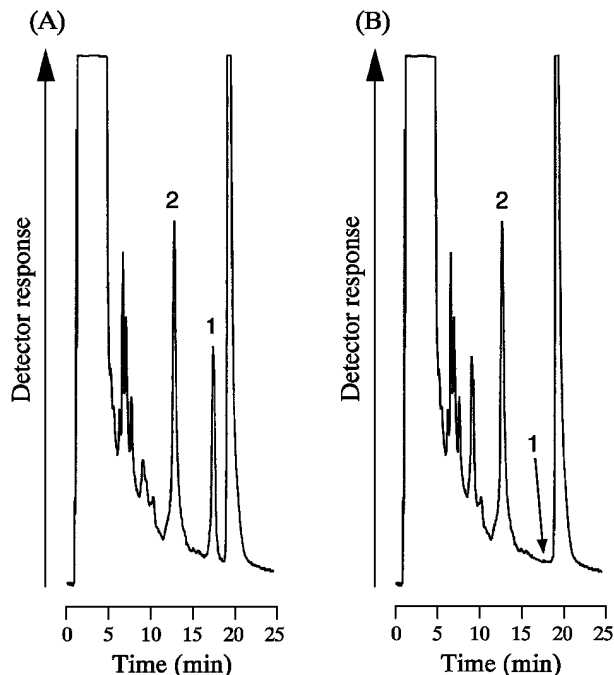


Fig. 4. Chromatograms Obtained with the Water Contacted to the Baby Bottles Made of (A) Polycarbonate and (B) Glass

Peaks and concentration, 1: bisphenol A (89 ppt from polycarbonate bottle and less than 1 ppt from glass bottle), 2: bisphenol F (internal standard), others: environmental substances and reagent blanks.

ミノ基の誘導体化も可能である。そこで、同一分子内にフェノール性水酸基及びアミノ基を有する化合物についてエキシマー蛍光誘導体化分析を試み、上記官能基を 2 ヶ所以上有する生体成分 (5-ヒドロキシインドールアミン類、カテコールアミン類やその代謝物など) の選択的検出が可能であることも見出し出している。

5. カルボン酸分析^{18,19)}

ヒト尿中ジカルボン酸は種々の有機酸尿症発症時に増加するので、その測定は疾病の診断や病因の究明に利用されている。そのため、簡便なマスキング法の構築及び精査診断法の開発が望まれている。そこで、尿中ジカルボン酸分析にエキシマー蛍光誘導体化法を適用し、有機酸尿症マスキングのための蛍光スペクトル分析法 (バッチ法) 及び精査診断のための HPLC 分析法を開発した。誘導体化試薬には、4-(1-Pyrene) butyric chloride hydrazide を用いた。

5-1. 蛍光スペクトル分析 (マスキング) 尿中には種々のジカルボン酸類が存在する。尿試料をピレン試薬で誘導体化し、反応液の蛍光強度を計

測することにより、添加した試薬やモノカルボン酸の妨害を受けることなく、ジカルボン酸総量を迅速に概算することができる。健常人及びII型グルタル酸尿症患者の尿試料から得られたスペクトルをFig. 5に示す。総ジカルボン酸量は、それぞれ0.38及び10.7 μmol アジピン酸/ml尿であった。患者尿中には健常人の数十倍のジカルボン酸が含まれているので、反応液のスペクトル分析により、有機酸尿症のマススクリーニングが可能であった。

5-2. HPLC分析(精査診断法) マススクリーニングにより有機酸尿症患者を抽出した後、その精査診断を行う必要がある。そのためにはジカルボン酸類を分別定量することが必須なので、HPLCでの分離分析を行った。健常人及びII型グルタル酸尿症患者の尿試料をHPLC分析したところ、グル

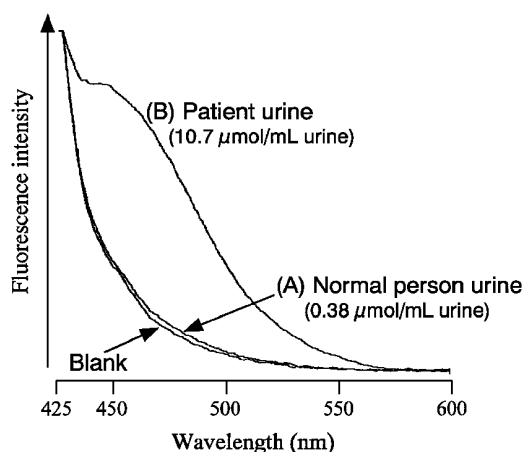


Fig. 5. Fluorescence Emission Spectra (Ex 345 nm) Obtained with the Urine Samples of (A) Normal Person and (B) the Patient with Glutaric Aciduria Type II

The total concentrations of dicarboxylic acids (μmol per ml urine) were calculated as adipic acid; normal person (0.38) and the patient with glutaric aciduria type II (10.7).

タル酸、アジピン酸、スベリン酸及びセバシン酸が分離定量された (Table 1). HPLC分析における4種ジカルボン酸の積算量と蛍光スペクトル分析でのジカルボン酸の概算量はほぼ同程度の値となった。

これらは本誘導体化法を行うことで、蛍光スペクトル分析でのマススクリーニング及びHPLC分析での精査分析が可能であることを示しており、有機酸尿症の診断に極めて有効である。

6. まとめ

エキシマー蛍光誘導体化法は高選択性、高感度性を併せ持つ実用的な蛍光誘導体化の手段である。本誘導体化法の他の化合物群への適用を積極的に進めていくとともに、これまでに開発された方法論の医療、生化学、環境、食品などの分野への実用化が期待される。

謝辞 本研究に際し、終始懇切なる御指導・御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部山口政俊教授に謹んで感謝の意を表します。本研究を行うにあたり、終始有益な御助言と御指導をいただきました福岡大学薬学部能田均助教授並びに(故)石田淳一助教授に深く感謝いたします。

本研究に、御協力、御支援いただきました福岡大学医学部の廣瀬伸一助教授、カロリンスカ研究所の吉武尚博士、浜松ホトニクスの中野行孝先生、化学物質評価研究機構の一瀬文雄先生、福岡大学薬学部の数田朝子、轟木堅一郎、小磯克己、園田純一郎、原田元、荒木淳也、吉武誠、原田由美子、堀田佳代子の諸氏に心より御礼申し上げます。

本研究は、文部科学省科学研究費補助金、福岡県産業・科学技術振興財団助成金並びに福岡大学研究

Table 1. Urinary Dicarboxylic Acids (nmol per ml urine) in Normal Persons and a Patient with Glutaric Aciduria Type II

| | HPLC analysis | | | | Total | Spectroscopic analysis ^{a)} |
|-------------------------------------------------|---------------|---------------|--------------|--------------|-------|--------------------------------------|
| | Adipic acid | Glutaric acid | Suberic acid | Sebacic acid | | |
| Normal person (age, sex) | | | | | | |
| (22, male) | 70 | 230 | 120 | <1 | 420 | 380 |
| (23, male) | 70 | 90 | 80 | <1 | 240 | 240 |
| (23, male) | 70 | 320 | 130 | <1 | 520 | 480 |
| Glutaric aciduria type II patient ^{b)} | 5200 | 2100 | 870 | 2100 | 10270 | 10700 |

a) The amounts were calculated as adipic acid. b) Age and sex are unknown.

推進部領域別研究チーム助成金を賜ることにより遂行できたものであり、併せて感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Ohkura Y., Kai M., Nohta H., *J. Chromatogr. B*, **659**, 85–107 (1994).
- 2) Yamaguchi M., Ishida J., “Reagents for Fluorescence Detection,” Modern derivatization methods for separation sciences, ed. by Toyo’oka T., John Wiley and Sons Ltd., New York, 1999, pp. 99–166.
- 3) Fukushima K., Usui N., Santa Y., Imai K., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1655–1687 (2003).
- 4) Förster T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **8**, 333–343 (1969).
- 5) Lehrer S. S., *Method. Enzymol.*, **278**, 286–295 (1997).
- 6) Haugland R. P.: <http://www.probes.com/>, Molecular Probes Inc. Web Site.
- 7) Satozono H., Nohta H., Japan. Patent 142228 (1998).
- 8) Nohta H., Satozono H., Koiso K., Yoshida H., Ishida J., Yamaguchi M., *Anal. Chem.*, **72**, 4199–4204 (2000).
- 9) Yoshida H., Harada H., Nakano Y., Nohta H., Ishida J., Yamaguchi M., *J. Chromatogr. B*, submitted.
- 10) Paproski R. E., Roy K. I., Lucy C. A., *J. Chromatogr. A*, **946**, 265–273 (2002).
- 11) Yoshida H., Nakano Y., Koiso K., Nohta H., Ishida J., Yamaguchi M., *Anal. Sci.*, **17**, 107–112 (2001).
- 12) Yamaguchi M., Nohta H., Yoshida H., Yoshitake T., Ichinose F., Japan. Patent 242174 (2001).
- 13) Yoshitake T., Ichinose F., Yoshida H., Todoroki K., Kehr J., Inoue O., Nohta H., Yamaguchi M., *Biomed. Chromatogr.*, in press.
- 14) Nakano Y., Nohta H., Yoshida H., Saita T., Fujito H., Mori M., Yamaguchi M., *J. Chromatogr. B*, **774**, 165–172 (2002).
- 15) Nakano Y., Nohta H., Yoshida H., Saita T., Fujito H., Mori M., Yamaguchi M., *Biomed. Chromatogr.*, submitted.
- 16) Nohta H., Yoshida H., Yamaguchi M., Japan. Patent 165859 (2001).
- 17) Yoshida H., Harada H., Nohta H., Yamaguchi M., *Anal. Chim. Acta*, **488**, 211–221 (2003).
- 18) Nohta H., Satozono H., Sonoda J., Yoshida H., Yamaguchi M., Japan. Patent 281578 (1999).
- 19) Nohta H., Sonoda J., Yoshida H., Satozono H., Ishida J., Yamaguchi M., *J. Chromatogr. A*, in press.