

キノンの選択的蛍光・化学発光定量法の開発と環境・生体分析への応用

岸川直哉

Development of Selective Determination Methods for Quinones with Fluorescence and Chemiluminescence Detection and Their Application to Environmental and Biological Samples

Naoya KISHIKAWA

Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

(Received May 27, 2010)

Quinones are compounds that have various characteristics such as a biological electron transporter, an industrial product and a harmful environmental pollutant. Therefore, an effective determination method for quinones is required in many fields. This review describes the development of sensitive and selective determination methods for quinones based on some detection principles and their application to analyses in environmental, pharmaceutical and biological samples. Firstly, a fluorescence method was developed based on fluorogenic derivatization of quinones and applied to environmental analysis. Secondly, a luminol chemiluminescence method was developed based on generation of reactive oxygen species through the redox cycle of quinone and applied to pharmaceutical analysis. Thirdly, a photo-induced chemiluminescence method was developed based on formation of reactive oxygen species and fluorophore or chemiluminescence enhancer by the photoreaction of quinones and applied to biological and environmental analyses.

Key words—quinone; fluorescence; chemiluminescence; HPLC; environmental analysis; biological analysis

1. はじめに

キノンは薬理的あるいは毒性学的観点から生体にとって非常に興味深い化合物である。例えば、数多くの酵素系の電子伝達反応にユビキノロンやピロロキノリンキノロンといったキノンが大きく関与することが知られており、¹⁾ 血液凝固や骨硬化に関与しているビタミン K はナフトキノン誘導体である。²⁾ このように重要な機能を有する生体内在性キノン以外にも、様々な産業上の用途のために製造・利用されているキノンもある。例えば、キノン構造を有するドキソルビシンなどのアンスラサイクリン系抗腫瘍薬はがん治療のために臨床的に用いられているほか、³⁾ ある種のキノンは染料、漂白剤あるいは農薬として多方面で使用されている。また、環境中に存在するキノンは生体に対して種々の有害作用をもたらすとされており、実際にディーゼル排気微粒子の

毒性発現にはその中に含まれる多環芳香族炭化水素キノンが関与しているとの報告がある。⁴⁾ このような背景から、キノン濃度の測定は様々な分野において必要とされており、そのために選択的かつ高感度なキノンの定量法の開発が求められている。

筆者らはキノンに特徴的な性質を利用することで、選択的かつ高感度なキノンの蛍光・化学発光定量法を開発し、生体及び環境試料中に含まれる様々なキノンの定量へと応用してきた。本稿ではそれらの方法の概要について紹介する。

2. キノンの発光誘導体化定量法の開発と環境試料分析への応用

2-1. 9,10-フェナンスレンキノンのプレカラム蛍光誘導体化 HPLC 定量法の開発⁵⁾ 9,10-フェナンスレンキノロン (9,10-phenanthrenequinone, PQ) は化石燃料の熱分解により発生し、自動車などの排気ガス中に見い出されているキノンである。また、化石燃料由来の大気汚染物質であるフェナンスレンが、大気中で光酸化を受けることにより生成することも考えられている。PQ には、生体内で活性酸素を

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 (〒852-8521 長崎市文教町 1-14)

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

本総説は、平成 21 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。

発生し、酸化的ダメージを与えることや⁶⁾一酸化窒素合成酵素等の活性部位と反応し、その機能を阻害することが知られており、⁷⁾大気汚染によってもたらされる種々の疾患に関与していると考えられている。このようなことから、PQの環境中濃度のモニタリングが必要であると考えられるが、PQを対象とする効果的な分析法は開発されておらず、その詳細な環境中濃度や動態は明らかにされていない。

PQを始めとするキノンは一般に蛍光性が弱く、蛍光検出法による高感度定量は困難であった。筆者らはPQがベンズアルデヒド及び酢酸アンモニウムと混合・加熱することにより、強蛍光性である2-フェニル-1*H*-フェナンスロ-9,10-*d*-イミダゾールへと変換されることを見出し [Fig. 1(A)], この反応を利用するPQのプレカラム蛍光誘導体化HPLC定量法を開発した。本法で誘導体化試薬として用いる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化合物であることから、試薬ブランクの影響をほとんど受けずにPQ誘導体を検出可能であった (Fig. 2)。本法によるPQの検出下限は5 fmol/injection であり、それまでに報告されていたGC-MSによる定量法⁸⁾と比較して200倍程度高感度であった。本法を用いて、大気粉じん試料中のPQ濃度を測定したところ、共存成分の影響を受けることなくPQを良好に定量可能であった (Fig. 2)。

2-2. 市街地における9,10-フェナンスレンキノンの大気内動態解析⁹⁾ PQのプレカラム蛍光誘導体化HPLC定量法を用いて、一年間にわたって長崎市街地中心部で捕集した大気粉じん中のPQ濃度を定量することで、その詳細な環境内動態の解析

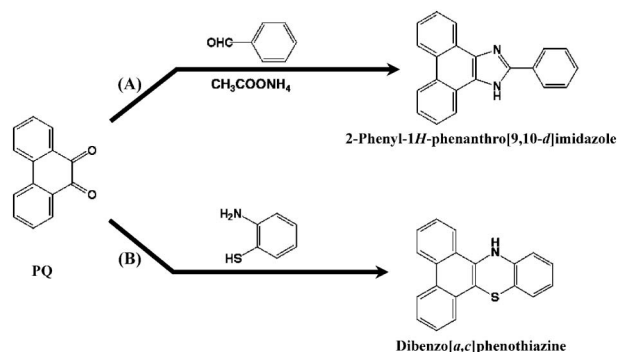


Fig. 1. Fluorogenic Derivatization Reaction of PQ
(A) with benzaldehyde and ammonium acetate for pre-column method.
(B) with 2-aminothiophenol for post-column method.

を行った。長崎市におけるPQの平均濃度は0.287 ng/m³であり、この値はロサンゼルス都市部やボストンといった他都市での測定値とほぼ同程度であった。また、大気中のPQ濃度には冬期に高く夏期に低いという季節変動 (Fig. 3) が観察され、この理由として冬期の高い大気安定性が考えられた。また、週末よりも交通量の多い平日にPQ濃度は上昇していたことから、PQの発生に自動車等の移動発生源が関与していることが示唆された。さらに、PQと他の大気汚染物質との関連性を調査したところ、PQ濃度はその親化合物であると考えられるフェナンスレン濃度や自動車由来の大気汚染物質である窒素酸化物濃度と正の相関を示すという結果が得られ、これらの結果からも都市部におけるPQ

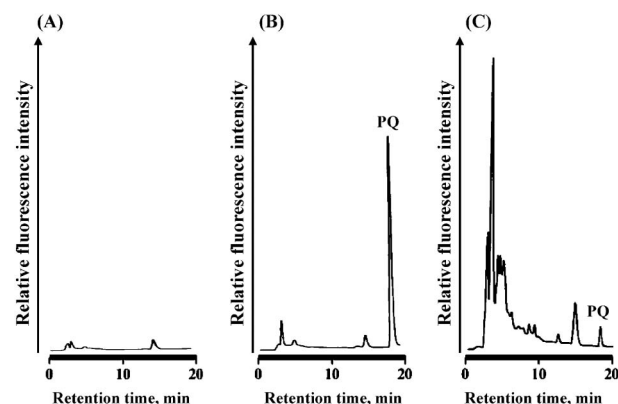


Fig. 2. Chromatograms of (A) reagent blank, (B) standard PQ solution and (C) PQ in extract from airborne particulates. Printed from Ref. 5 with permission from Elsevier Science

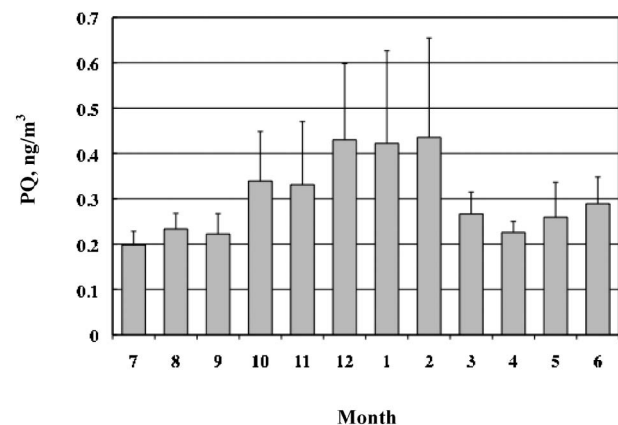


Fig. 3. Monthly Variation of PQ in Airborne Particulates Collected in Weekdays from July 1997 to June 1998
Each column and vertical bar represent the mean and standard deviation, respectively. Printed from Ref. 9 with permission from Elsevier Science, with modification.

の発生には移動発生源が関与していることが疑われた。

2-3. 9,10-フェナンスレンキノンのポストカラム蛍光誘導体化 HPLC 定量法の開発¹⁰⁾ 環境汚染物質の日常的な濃度モニタリングのためには、簡便かつ迅速なポストカラム誘導体化 HPLC 定量法が適している。しかしながら、ベンズアルデヒド及び酢酸アンモニウムを試薬として用いる方法は高感度ではあるが、HPLC への注入前に比較的長時間かつ高温での加熱操作が必要であり、簡便性及び迅速性の点で十分ではなかった。筆者らは PQ を酸性条件下で 2-アミノチオフェノールと反応させることにより、比較的温和な条件で PQ を迅速に蛍光物質へと変換可能な反応を見出した [Fig. 1 (B)]。そこで、2-アミノチオフェノールを試薬として用いるポストカラム蛍光誘導体化 HPLC 定量法の開発を行った。本法は、カラムで分離後の PQ を 2-アミノチオフェノール及び硫酸を含む溶液と混合して加熱することにより、PQ をオンラインで蛍光物質へと変換してから検出する方法である。開発した方法における PQ の検出下限は 67 fmol/injection とプレカラム蛍光誘導体化法と比較すると低感度ではあったが、本法は大気粉じん抽出溶液を直接 HPLC システムに注入することで PQ 濃度を定量可能であり、分析操作の簡略化と分析時間の短縮化が達成された。

3. キノンの酸化還元サイクルを利用するルミノール化学発光定量法の開発と医薬品分析への応用¹¹⁾

キノンは生体内の還元物質により不安定なセミキノ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ときに活性酸素を生成し、セミキノラジカル自身は再び元のキノンへと酸化されるという酸化還元サイクルを有している。⁶⁾ この酸化還元サイクルに伴う活性酸素の生成が、キノンの毒性に関与していると考えられている。一方で、ルミノールを始めとする多くの化学発光試薬は活性酸素との反応により発光を生じることが知られており、活性酸素の定量に広く用いられている。¹²⁾ そこで、酸化還元サイクルにより発生する活性酸素をルミノールにより化学発光検出するという原理に基づくキノンのルミノール化学発光定量法の開発を行った。

キノンとルミノール溶液を小試験管内で混合後

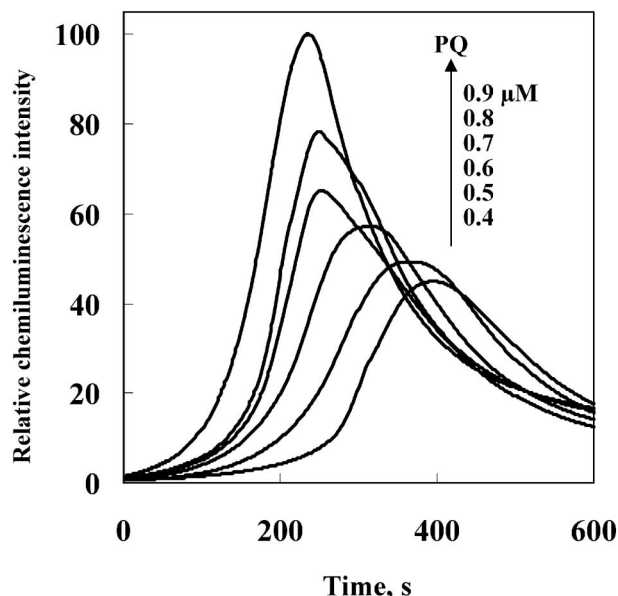


Fig. 4. Time Profiles of Chemiluminescence Emission Obtained from 0.4 to 0.9 μM of PQ after Mixing with Luminol and DTT

Printed from Ref. 11 with permission from Springer.

に、還元剤としてジチオスレイトール(dithiothreitol, DTT)を添加することで長時間持続する強い発光が観察された。この発光はキノンと DTT が共存するときのみ生じ、その発光強度とキノン濃度との間には良好な直線関係が認められた (Fig. 4)。生体内で重要な機能を有するユビキノン、ビタミン K 及びピロロキノリンキノンといったキノンも本反応により発光を示すことが確認され、これらのキノンの定量に応用可能であると考えられた。そこで、本反応を利用する製剤中ユビキノンの簡便かつ迅速な化学発光定量法の開発を行った。開発した方法は製剤をエタノールに溶解・希釈した試料溶液に、ルミノール及び DTT を添加することで生じる発光を測定する簡便な方法であり、1 検体あたり 30 秒と製剤中ユビキノンの含量を迅速に測定可能であった。本法は日本薬局方収載の HPLC 法 (1 検体あたり 10 分) と比較して極めて測定時間が短く、有機溶媒の消費量も低減可能な方法であった。

4. 紫外線照射を利用するキノンの化学発光定量法の開発と応用

4-1. 紫外線照射を利用するキノンの過シュウ酸エステル化学発光定量法の開発と生体試料分析への応用¹³⁻¹⁵⁾ 過シュウ酸エステル化学発光は、シュウ酸エステルと過酸化水素との反応により活性中間

体が生じ、このエネルギーが共存する蛍光物質へと移動することにより蛍光物質が励起され、発光が生じるという反応である。過シュウ酸エステル化学発光は蛍光物質の高感度検出に用いられているが、無蛍光性であるキノンを過シュウ酸エステル化学発光により検出することは困難であった。筆者らは、紫外線照射を行ったキノン溶液にシュウ酸エステルを添加するだけで、過酸化水素を添加しないにもかかわらず発光を生じるという現象を見出した。この反応の発光メカニズムを調査した結果、キノンに紫外線を照射することで過酸化水素と蛍光物質である3,6-ジヒドロキシフタル酸 (3,6-dihydroxyphthalic acid, DHPA) が同時に生成し、これらとシュウ酸エステルとの反応により、化学発光が生じていることを明らかにした。¹³⁾ そこで、この原理に基づくキノンの HPLC 定量法を開発した。すなわち、カラムで分離後のキノンにオンラインで紫外線を照射後、シュウ酸エステルのみを含む溶液と混合し、生じる発光を検出するという方法である。本法はキノンに極めて選択的であり、生体内成分の妨害を受けることなく生体試料中のキノンを定量可能であった。実際に、ヒト血漿中のビタミン K 類の定量 (Fig. 5)¹⁴⁾ やドキシソルピシン及びその代謝物ドキシソルピシノールのラット血中濃度モニタリング (Fig. 6)¹⁵⁾ に本法を応用したところ、他法でのクロマトグラムよりも夾雑ピークの極めて少ないシンプルなクロマトグラムを得ることが可能であった。

4-2. 紫外線照射を利用するキノンのルミノール化学発光定量法の開発と環境試料分析への応用¹⁶⁾

筆者らは上記研究を進める過程において、キノンの光分解産物である DHPA がルミノール化学発光反応の効果的な増強剤としての機能を有することを見出した。そこで、紫外線照射によりキノンから活性酸素と化学発光増強剤が同時に生成するという現象を利用するキノンのルミノール化学発光定量法を開発した。紫外線照射により複数の活性酸素種が発生するが、特異的な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発光に強く関係することを明らかにした。さらに ESR 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ていると考えられた。本原理に基づいて、大気中に

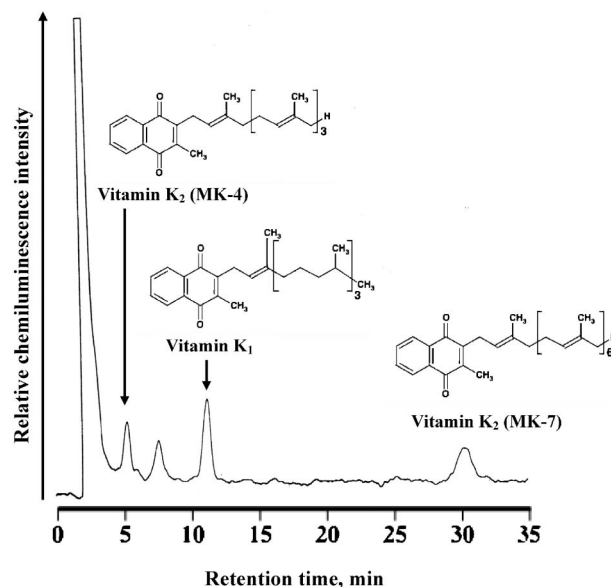


Fig. 5. Chromatogram of Vitamin K Homologues in Extract from Human Plasma

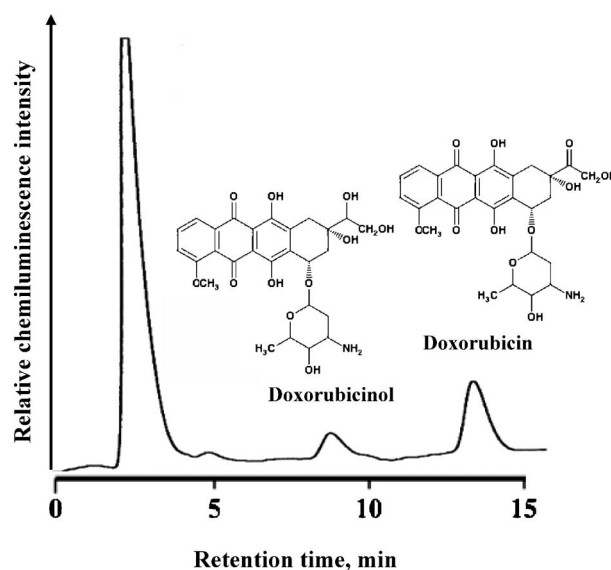


Fig. 6. Chromatogram of Doxorubicin and Doxorubicinol in Extract from Rat Plasma after 60 min of Single-dose Administration of 5 mg/kg Doxorubicin

その存在が見い出されている4種類のキノン (PQ, 1,2-ナフトキノン, 1,4-ナフトキノン及び9,10-アンスラキノン) を対象に HPLC 定量法を開発した。本法の検出下限 (S/N=3) は 1.5–24 fmol/injection であり、この感度は GC-MS による方法⁸⁾ より約 1000 倍、LC-MS/MS を用いる方法¹⁷⁾ より 3–16 倍程度高感度であり、質量分析装置と比較して安価かつ簡易な装置構成でありながら優れた感度を達成

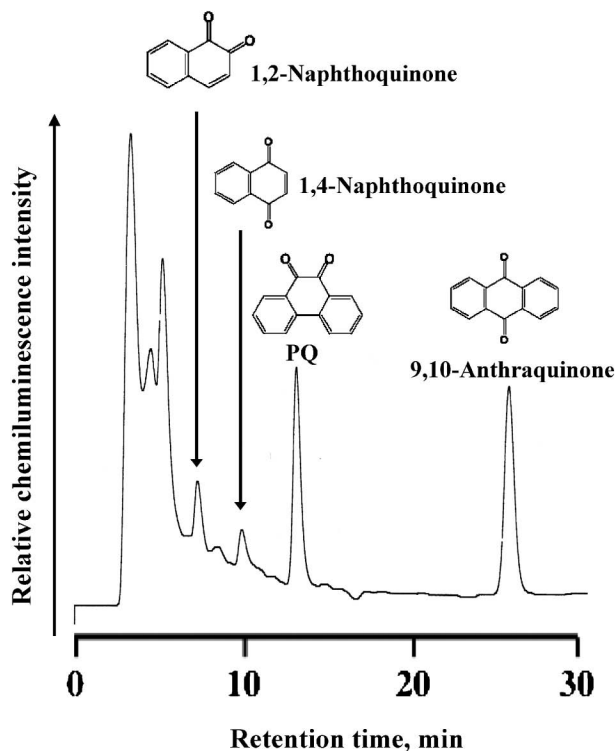


Fig. 7. Chromatogram of Quinones in Extract from Airborne Particulates

できた。本法を長崎市街地で捕集した大気粉じん試料へと応用したところ、4種類のキノンを良好に定量可能であった (Fig. 7)。

5. まとめ

本研究で開発したキノンの蛍光・化学発光定量法は、多数の夾雑成分が共存する生体や環境試料中の微量キノンの定量が可能である。生体内には電子伝達物質として働くキノンや抗酸化剤として活性酸素から生体を防御するキノン等、様々な役割を有するキノンが存在する。これら以外にも、重要な働きを有する未知のキノンが生体内に存在している可能性があり、そのようなキノンの探索に本研究で開発した方法は利用可能であると考えている。また、環境中に存在する有害性キノンの生体影響は酵素活性阻害や活性酸素発生による酸化的ダメージ等多岐にわたっており、生体に与える危険性はまだ十分に明らかにされていない。このような有害性キノンの環境内での発生源の特定や生体内での毒性発現機構の解明に、キノンの蛍光・化学発光定量法は有用な手段となり、有害性キノンの無毒化やその発生量の低減に貢献することが期待される。

謝辞 本研究に際し、終始懇切丁寧な御指導・御鞭撻を賜りました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科黒田直敬教授に謹んで感謝の意を表します。また、種々の有益な御助言と御指導を賜りました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科中島憲一郎教授に深く御礼申し上げます。本研究において、御協力・御支援頂きました長崎国際大学の大庭義史教授、熊本大学の黒崎博雅准教授、長崎大学の和田光弘准教授、真木俊英准教授及び大山 要助教に心より感謝致します。本研究の遂行にご協力頂きました Sameh Ahmed 君、大久保信宏君、中島 一君、藤井 収君、中尾麻衣子さんを始めとする長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬品分析化学研究室及び医療情報解析学研究室の皆様感謝申し上げます。本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金の助成により遂行されました、併せて御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Overvad K., Diamant B., Holm L., Hølmer G., Mortensen S. A., Stender S., *Eur. J. Clin. Nutr.*, **53**, 764-770 (1999).
- 2) Shearer M. J., *Lancet*, **345**, 229-234 (1995).
- 3) Hortobagyi G. N., *Drugs*, **54**, 1-7 (1997).
- 4) Bekki K., Takigami H., Suzuki G., Tang N., Hayakawa K., *J. Health Sci.*, **55**, 601-610 (2009).
- 5) Kishikawa N., Wada M., Ohba Y., Nakashima K., Kuroda N., *J. Chromatogr. A*, **1057**, 83-88 (2004).
- 6) Motoyama Y., Bekki K., Sang W. C., Tang N., Kameda T., Toriba A., Taguchi K., Hayakawa K., *J. Health Sci.*, **55**, 845-850 (2009).
- 7) Taguchi K., Kumagai Y., Endo A., Kikushima M., Ishii Y., Shimojo N., *J. Health Sci.*, **47**, 571-574 (2009).
- 8) Cho A. K., Stefano E. D., You Y., Rodriguez C. E., Shmitz D. A., Kumagai Y., Miguel A. H., Fernandez A. E., Kobayashi T., Avol E., Froines J. R., *Aerosol Sci. Technol.*, **38**, 68-81 (2004).
- 9) Kishikawa N., Nakao M., Ohba Y., Nakashima K., Kuroda N., *Chemosphere*, **64**, 834-838 (2006).
- 10) Kishikawa N., Nakashima H., Ohyama K., Nakashima K., Kuroda N., *Talanta*, **81**, 1852-1855 (2010).

- 11) Kishikawa N., Ohkubo N., Ohyama K., Nakashima K., Kuroda N., *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**, 1337–1343 (2009).
- 12) Yamaguchi S., Kishikawa N., Ohyama K., Ohba Y., Kohno M., Masuda T., Takadate A., Nakashima K., Kuroda N., *Anal. Chim. Acta*, **665**, 74–78 (2010).
- 13) Ahmed S., Fujii S., Kishikawa N., Ohba Y., Nakashima K., Kuroda N., *J. Chromatogr. A*, **1133**, 76–82 (2006).
- 14) Ahmed S., Kishikawa N., Nakashima K., Kuroda N., *Anal. Chim. Acta*, **591**, 148–154 (2007).
- 15) Ahmed S., Kishikawa N., Ohyama K., Wada M., Nakashima K., Kuroda N., *Talanta*, **78**, 94–100 (2009).
- 16) Ahmed S., Kishikawa N., Ohyama K., Maki T., Kurosaki H., Nakashima K., Kuroda N., *J. Chromatogr. A*, **1216**, 3977–3984 (2009).
- 17) Delhomme O., Millet M., Herckes P., *Talanta*, **74**, 703–710 (2008).