

微量生体成分の高感度・高選択的蛍光誘導体化-HPLC 分析法の開発

轟木堅一郎

Development of Novel Fluorescence-Derivatization-HPLC Methods Enabling Highly Sensitive and Selective Analysis of Biological Compounds

Kenichiro TODOROKI

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

(Received April 11, 2011)

Fluorescence-derivatization-HPLC methods are powerful tools for performing the analysis of bioactive compounds with high sensitivity and selectivity. In this paper, the author reviews the development of the following four types of novel fluorescence-derivatization-HPLC analytical systems: (1) simultaneous HPLC analysis of melatonin and its related compounds through post-column electrochemical demethylation and fluorescence derivatization, (2) HPLC analysis of 5-hydroxyindoles based on fluorescence derivatization by online pre-column photocatalytic oxidation with benzylamine, (3) reagent peak-free HPLC analysis for aliphatic amines and amino acids using F-trap pyrene as a fluoruous tag-bound fluorescence derivatization reagent, and (4) reagent peak-free HPLC analysis for carboxylic acids using a fluoruous scavenging-derivatization method. The authors have also successfully applied these systems to biological and pharmaceutical analyses.

Key words—fluorescence derivatization; pinpoint targeting reagent; electrochemical oxidation; photocatalytic oxidation; fluoruous separation

1. はじめに

近年、臨床診断や医薬品開発、生体機能解明研究などの分野において、複雑な生体試料中から目的とする微量成分のみを高感度かつ選択的に分析する必要性が高まっている。生体試料は極めて複雑、多種多様な成分から構成されている。また、その試料中に含まれる生体成分の多くが極微量で存在し、かつ不安定である。したがって、生体成分分析には、高分離能、高感度、簡便性が要求される。この要求に応える分析法として HPLC を分離手段とした蛍光検出法が有用となる。近年では、光学機器の飛躍的な進歩もあいまって、生体分子を 1 分子単位でイメージングできるほどの超高感度化も実現されているが、一般に生体成分は非蛍光性であることから目

的成分のみを蛍光物質に変換する操作、すなわち、蛍光誘導体化が必要となる。

筆者らは、従来の蛍光誘導体化-HPLC 分析法に独自の着想を加え発展させた分析法を開発し、これらを製剤や生体試料の分析に適用することで生命科学分野、臨床診断分野から社会貢献することを目指し研究を進めてきた。本稿では、これまでに得られた知見を紹介する。

2. 電解反応を利用したメラトニン関連化合物のポストカラム HPLC 蛍光分析システムの開発¹⁾

既存の蛍光誘導体化試薬のほとんどは、特定の官能基（アミン、チオール、ケトンなど）に対し選択的に反応する官能基認識型であるが、その官能基を有する成分はすべて誘導体化されるため、生体試料中の目的成分を計測する場合、複雑な前処理操作や洗練された HPLC 分離が必要となる。これに対し、誘導体化試薬が官能基認識型ではなく特定の化合物群のみを認識して反応する Pinpoint Targeting 試薬の場合、この選択性は飛躍的に向上することから、生体成分分析において理想的な誘導体化試薬と

福岡大学薬学部（〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1）

現所属：静岡県立大学薬学部（〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1）

e-mail: todoroki@u-shizuoka-ken.ac.jp

本総説は、平成 22 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。

いえる。このような条件を満たす試薬は決して多くはないが、その一つとして、当研究室において見いだされたベンジルアミンが挙げられる。

ベンジルアミンなどの芳香族メチルアミン類は、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムの存在下、セロトニン(5-ヒドロキシトリプタミン; 5-HT)等の5-ヒドロキシインドール類(5-HIs)と選択的に反応することで、強蛍光性のベンゾオキサゾール誘導体を与える(Fig. 1).²⁾

先にわれわれはベンジルアミンを用い、5-HIsの高感度分析について報告してきた。³⁻⁶⁾今回、メラトニンに代表される5-メトキシインドール(5-MIs)類に対しても電解反応を組み合わせることで誘導体化分析できるシステムを構築した。

Figure 2に開発したHPLCシステムの概略図を示す。

カラムにより分離された5-MIsは、オンラインで配置した電解セル(EC₁, EC₂)により、電解酸化還元反応を受け、5-HIsへと脱メチル化される。引き続きベンジルアミンと酸化剤の存在により70°Cの反応コイル(RC)内でポストカラム蛍光誘導

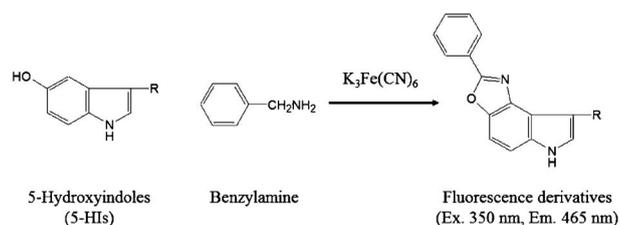


Fig. 1. Fluorescence Derivatization Reaction of 5-hydroxyindoles with Benzylamine in the Presence of Potassium Hexacyanoferrate (III)

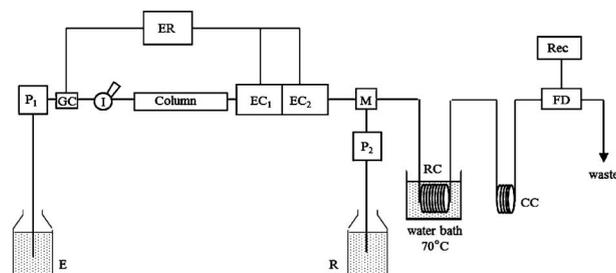


Fig. 2. Schematic Flow Diagram of the Post-column HPLC-fluorescence Derivatization System for the Analysis of 5-MIs

P₁ and P₂, HPLC pumps; I, injection valve (20 μ l); GC, guard cell; EC₁ and EC₂, electrolytic cells; M, mixing device; RC, reaction coil; CC, cooling coil; ER, electrolytic regulator (coulometer); FD, fluorescence detector; Rec, integrator; E, eluent; R, reagent solution.

体化することで、高感度検出した。本システムによる5-MIsの検出限界は、注入量当たり12-93 fmolと高感度であった。また、本システムにより、5-MIsのみならず、5-HIs、一部の catechol 類及び indole 類の分析も可能であった。本システムを市販のメラトニン製剤中の不純物解析に適用したところ、極微量の不純物であるトリプトファール、トリプタミン及び *N*-アセチルセロトニン (NAS) のピークを検出することができた。また、ポストカラム反応条件を変化させることで、5-MIs、自然蛍光性物質及び5-HIsをそれぞれ分別して検出することが可能であった。

3. 光触媒酸化反応を利用した5-HIsの蛍光誘導体化HPLC分析システムの開発^{7,8)}

前述のようにベンジルアミンを蛍光誘導体化試薬とする5-HIsの蛍光誘導体化法は優れた特徴を有しているが、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを酸化剤とする化学酸化反応を必要とすることから以下のような問題点も指摘されている。まず、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムが有害物質であること；その溶液は不安定な性質であるために用時調製が必要であること；更にヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムはHPLC流路及び検出器フローセルに沈着することから、感度の低下やバックグラウンドノイズの増大を引き起こすこと；多量に共存する酸化剤の作用により、生成した蛍光誘導体自身の酸化的分解が認められること、などが挙げられる。そこで、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムなどの有害な酸化剤を使用しないクリーンな酸化反応を本誘導体化反応に導入するべく、近年その利用が広がりつつある光触媒酸化反応に着目し、同反応を誘導体化反応に適用した5-HIsのプレカラム蛍光誘導体化-HPLC分析法を開発した。⁷⁾これにより光触媒酸化反応によっても化学酸化法と同様に誘導体化反応が進行することを見出した。さらに装置の自動化を目指し、5-HIsのオンラインプレカラム蛍光誘導体化HPLC分析システムを開発した。⁸⁾Figure 3に本システムの概略図を示す。

本システムには、オンライン光触媒酸化により5-HIsの蛍光誘導体化を進行させるための光触媒反応カラム(RC)が組み込まれている。このカラムは、酸化チタンを強固に固定化した微小ガラスビーズを耐圧性のテフゼルチューブ中に充填したもので

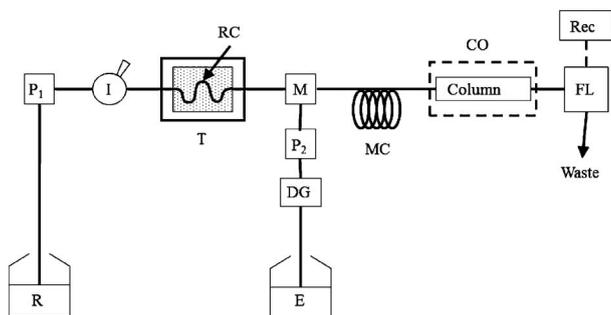


Fig. 3. Schematic Flow Diagram of the Online Pre-column HPLC-fluorescence Derivatization System for the Analysis of 5-HIs

P₁ and P₂, HPLC pumps; DG, degasser; I, injection valve (5 μ l); T, transilluminator (365 nm, 25 W \times 4); R, reagent solution; RC, reaction column; M, mixing tee; MC, mixing coil; E, eluent; CO, column oven; FL, fluorescence detector; Rec, integrator.

あり、分析用の HPLC システムに直接接続が可能で、耐圧性、耐久性においても優れていた。本分析システムにより、5-HIs は酸化剤を添加することなく、約 365 nm の紫外線照射下、ベンジルアミンと反応し、オンラインで蛍光誘導体化分析された。本システムによる 5-HIs の検出限界は注入量当たり、それぞれ 360 fmol (5-HT), 300 fmol (5-HIAA), 160 fmol (NAS) であり、この結果は、前述の化学酸化法には及ばなかったが、今後、より高活性な反応カラムの作製やポストカラム法の導入により更なる高感度化が期待できる。本システムの有用性を実証するために、本システムを健康人尿中の 5-HIAA 定量に適用したところ、30 分以内に単一のピークとして分離・検出された (Fig. 4)。

本法は 5-HIAA のピークのみを選択的にクロマトグラム上に示すことができたことから、カルチノイド症候群、ダンピング症候群などの診断、治療経過のモニタリングだけでなく、これらの病態機構の解明、基礎研究などにおいても大いに役立つと考えられる。

4. 生体アミン分析のための F-trap 蛍光誘導体化-HPLC 分析法の開発⁹⁾

市販の蛍光誘導体化試薬のほとんどは過剰に加えた未反応試薬が大きなピークとして検出されるため、目的成分との HPLC 分離を複雑にする。われわれはこの問題を解決すべく、親フッ素性化合物同士の相互作用に基づくフルオラス分離技術と蛍光誘導体化法を融合させた F-trap 蛍光誘導体化法という試薬ピークを出さないアミン類の蛍光誘導体化-

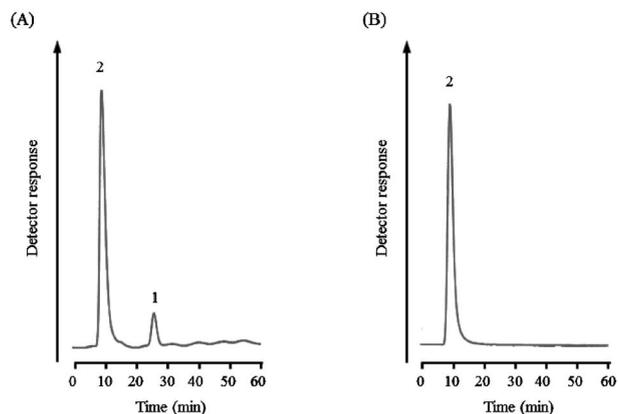


Fig. 4. Chromatograms of a Urine Sample Obtained from a Healthy Human Subject: (A) under Near-UV Irradiation, (B) without Near-UV Irradiation

A portion (500 μ l) of urine was treated as described in Ref. 8. Peaks: (1) 5-HIAA (25.2 μ mol l⁻¹), (2) endogenous fluorescent compounds.

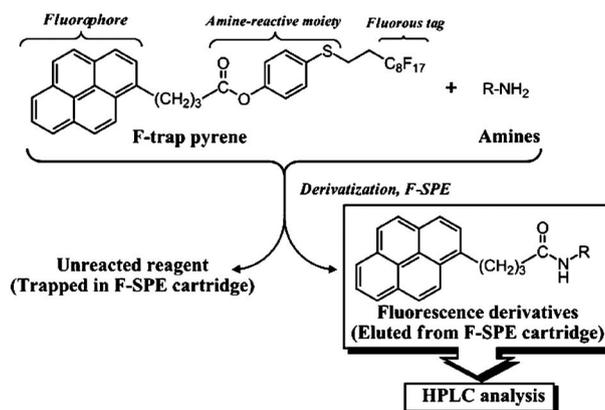


Fig. 5. Fluorescence Derivatization of Aliphatic Amines Using F-trap Pyrene

HPLC 分析法を開発した。フルオラス分離では化合物の極性ではなく親フッ素性のみが分離に影響するため、選択性の高い分離が可能となる。Figure 5 に F-trap 蛍光誘導体化法の原理を示す。

F-trap 型の蛍光誘導体化試薬は、蛍光部位、アミン反応性部位及びフルオラスタグの 3 つの部位から構成されており、未反応試薬のみがフルオラスタグをもつよう設計している。そのため分析対象成分との誘導体化反応後にフルオラス固相抽出 (F-SPE) を行うことで、未反応試薬のみを 99.9% 以上選択的に除去可能であった。これにより従来問題とされてきた過剰な未反応試薬の妨害を受けることなく脂肪族アミン (Fig. 6) やアミノ酸などを蛍光検出することが可能となった。

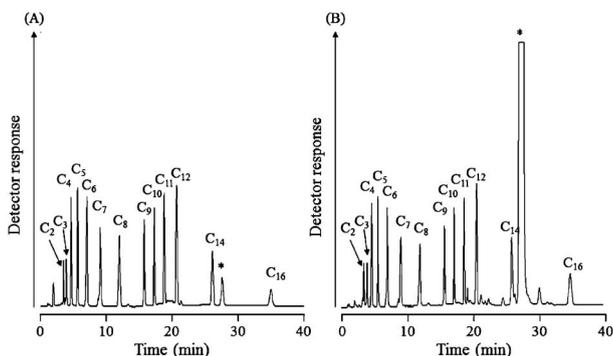


Fig. 6. Chromatograms of the Pyrene Derivatives of 13 Aliphatic Amines (A) with and (B) without F-SPE Treatment

50 pmol each on column. Peaks: C₂, ethylamine; C₃, propylamine; C₄, *n*-butylamine; C₅, *n*-pentylamine; C₆, *n*-hexylamine; C₇, *n*-heptylamine; C₈, *n*-octylamine; C₉, *n*-nonylamine; C₁₀, *n*-decylamine; C₁₁, *n*-undecylamine; C₁₂, *n*-dodecylamine; C₁₄, *n*-tetradecylamine; C₁₆, *n*-hexadecylamine; *F-trap pyrene.

本法は過剰な試薬ピークを検出することなく生理活性アミンやアミノ酸などを高感度かつ網羅的に解析できることから、メタボロミクス解析用ツールとしての利用が期待できる。

5. 有機酸分析のための Fluorous Scavenging Derivatization (FSD) 法の開発¹⁰⁾

試薬ピークが検出されない有機酸分析用蛍光誘導体化-HPLC 分析法として、FSD 法を開発した (Fig. 7)。

FSD 法では通常の誘導体化反応を行った後に、過剰に残存する未反応試薬をタグ化試薬によりフルオラス化する。フルオラス化された未反応試薬は F-SPE により選択的に吸着除去されることから、有機酸誘導体のみが HPLC 分析されることとなる。蛍光誘導体化試薬に 1-pyrenemethylamine (PMA) を、フルオラスタグ化試薬にアミン反応性の 2-(perfluorooctyl) ethyl isocyanate (PFOEI) を用い、高極性有機酸の蛍光誘導体化-HPLC 分析を行った。本分析において市販の F-SPE カートリッジは容量が大きく、微量試料を取り扱うには不向きであった。そこで、微量試料導入用の micro F-SPE スピニングラムを自作することで、サンプル注入量と溶出量を最小限に抑えた誘導体化法を構築することができた。本法を用いて TCA サイクル代謝物に係わる高極性有機酸 13 種を一斉分析したときのクロマトグラムを Fig. 8 (A) に示す。未反応の PMA のピークがほとんど検出されることがなく対象物を高感度かつ網羅的に分析することが可能であった。これ

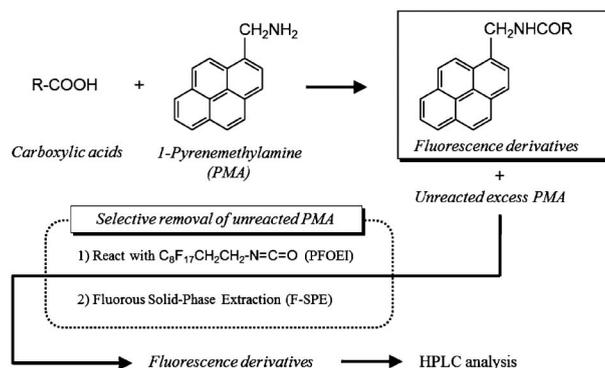


Fig. 7. Fluorous Scavenging Derivatization of Carboxylic Acids Using PMA and PFOEI

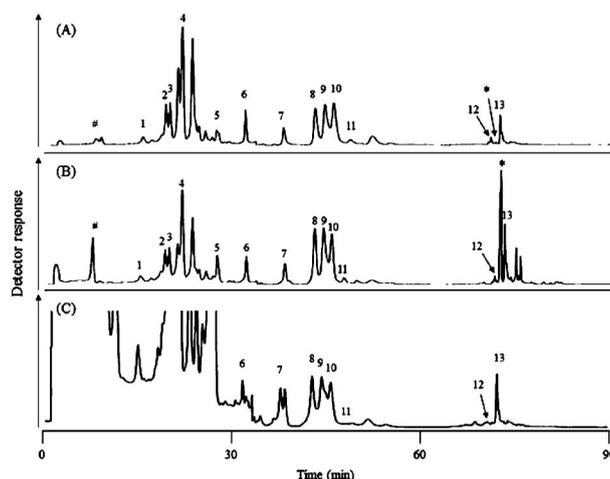


Fig. 8. Chromatograms of Pyrene Derivatives of α -keto Acids and TCA Cycle Metabolites (A) Treated with FSD, (B) Treated with Fluorous-tagging Reaction, and (C) without FSD

Peaks: 1, fumaric acid; 2, pyroglutamic acid; 3, glycolic acid; 4, lactic acid; 5, oxaloacetic acid and pyruvic acid; 6, 3-phenyllactic acid; 7, tartaric acid; 8, malic acid; 9, succinic acid; 10, 2-oxoglutaric acid; 11, malonic acid; 12, isocitric acid; 13, citric acid; [†]PMA; ^{*}fluorous-tagged PMA. Amounts of acid: 1.3 pmol (peaks 4 and 6), 2.6 pmol (peaks 2, 3 and 7), 5.2 pmol (peaks 1, 5, 8, 9, 10, 12 and 13), 10.4 pmol (peak 11). Other peaks are reaction by products and unknowns.

に対し、フルオラスタグ化のみを行い F-SPE 操作を行わなかった場合 [Fig. 8 (B)], フルオラスタグ化された PMA の大きなピークがイソクエン酸とクエン酸のピーク間に出現しそれらの分析を妨害していた。また、PMA による誘導体化のみを行った場合 [Fig. 8 (C)], 未反応 PMA のピークの妨害により、多くの高極性有機酸ピークが検出できなかった。

このように本法は過剰な試薬ピークを検出することなく高極性有機酸を高感度かつ網羅的に解析できることから、メタボロミクス解析用ツールとしての

利用が期待できる。

6. まとめ

以上述べたように、筆者らは蛍光誘導体化-HPLC分析法を礎として、4種の新規分析法を開発した。今回紹介した方法論はいずれも従来法の問題点を克服した簡便かつ実用的な分析法であり、製剤中または生体試料中の高感度分析に極めて有用であることを実証することができた。今後、これらの分析法が実際の医療現場や、生体機能解明研究等の幅広い分野にわたって大いに貢献できることを期待する。

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頂きました福岡大学薬学部能田均教授に深く感謝申し上げます。本研究に、御協力、御支援頂きました福岡大学薬学部の吉田秀幸准教授、カロリンスカ研究所の吉武尚博士、福岡大学薬学部の巴山忠助教、糸山美紀助教、石丸康作、中野正喜、中島佳彦、有坂雅恵、木原朋代、江藤英倫、美川智彦、橋本裕輝の諸氏、福岡大学工学部の中野勝之教授、大淵英子博士、安本和博氏を始めとする共同研究者の皆様に感謝申し上げます。

本研究は、文部科学省科学研究費補助金、日立科学技術財団倉田奨励金並びに福岡大学総合科学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) Todoroki K., Ishimaru K., Yoshida H., Yoshitake T., Nohta H., Yamaguchi M., *Anal. Sci.*, **22**, 281–286 (2006).
- 2) Ishida J., Yamaguchi M., Nakamura M., *Analyst*, **116**, 301 (1991).
- 3) Ishida J., Yoshitake T., Fujino K., Kawano K., Kehr J., Yamaguchi M., *Anal. Chim. Acta*, **365**, 227–232 (1998).
- 4) Yoshitake T., Iizuka R., Kehr J., Nohta H., Ishida J., Yamaguchi M., *J. Neurosci. Meth.*, **109**, 91–96 (2001).
- 5) Yoshitake T., Ichinose F., Yoshida H., Todoroki K., Kehr J., Nohta H., Yamaguchi M., *Biomed. Chromatogr.*, **17**, 509–516 (2003).
- 6) Yoshitake T., Wang F-H., Kuteeva E., Holmberg K., Yamaguchi M., Crawley J. N., Steiner R., Bartfai T., Ögren S. O., Hökfelt T., Kehr J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 354–359 (2004).
- 7) Todoroki K., Arisaka M., Nakashima Y., Yoshida H., Nohta H., Yamaguchi M., *Bunseki Kagaku*, **54**, 1211–1214 (2005).
- 8) Todoroki K., Nakashima Y., Yoshida H., Nohta H., Yamaguchi M., *Anal. Chim. Acta*, **555**, 14–19 (2006).
- 9) Todoroki K., Etoh H., Yoshida H., Nohta H., Yamaguchi M., *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 321–327 (2009).
- 10) Todoroki K., Hashimoto H., Mikawa T., Itoyama M., Hayama T., Kojima E., Yoshida H., Nohta H., Yamaguchi M., *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, 2409–2416 (2010).