

Selective determination of quinones in biological and environmental samples by HPLC with photo-induced chemiluminescence detection

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 Sameh Abdel-Raouf Ahmed

【目的】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キノンが大きく関与することが知られている。また、ナフトキノン誘導体であるビタミン K は血液凝固と骨硬化に関係している。さらに、キノン構造を有するドキソルピ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。キノンはまた、生体高分子と共有結合してその機能を阻害したり、生体内で活性酸素を生成し酸化的ダメージを与えることから、環境中に存在するキノンは生体に対して有害作用をもたらすとされている。実際に、都市大気に見出されるディーゼル排気微粒子の毒性発現には微粒子中に含まれるキノンが関与しているとの多くの報告がある。したがって、生体中や環境中のキノンをモニタリングするために、高感度かつ選択的なキノンの定量法の開発が必要とされている。

本研究では、キノンに特徴的な光化学反応を化学発光検出法と組み合わせることで、キノンに選択的かつ高感度な定量法を開発し、生体及び環境試料中のキノンの定量へと応用した。ここで開発した方法は、キノンに紫外線を照射することにより複数の化学発光反応性化合物を同時に生成させ、これらを繁用される化学発光反応である過シュウ酸エステル化学発光 (peroxyoxalate chemiluminescence, PO-CL) やルミノール化学発光 (luminol-CL) を用いて検出する原理に基づく方法である。

【実験方法】基本的な HPLC システムの模式図を Fig. 1 に示す。HPLC システムは 2 台の送液ポンプ、インジェクター、ODS カラム、紫外線照射装置、化学発光検出器及び記録計により構成されている。紫外線照射装置として、低圧水銀ランプ (254 nm) に PTFE チューブを巻きつけたものを自作した。移動相としてアセトニトリルとイミダゾール緩衝液の混液を使用し、化学発光試薬としてはシュウ酸エステルあるいはルミノール誘導体のみを含む溶液を使用した。

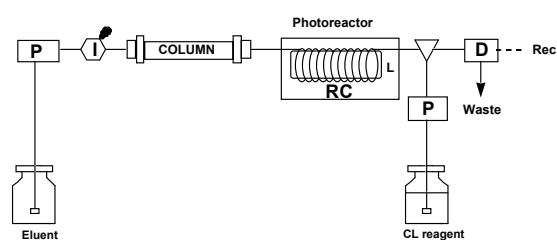


Fig. 1. HPLC-CL system used for determination of quinones.

P, pump; I, injector; L, low-pressure mercury lamp; RC, reaction coil; D, CL detector; Rec, recorder.

【結果及び考察】

I. キノンの HPLC-PO-CL 定量法の開発^[1]

最初に、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が同時に生成する現象を利用して、これらをシュウ酸エステルと混合することで生じる化学発光の検出に基づく定量法を開発した。キノンからの過酸化水素の発生は、過酸化水素を特異的に分解する酵素であるカタラーゼを固定化したリアクターを組み込んだフローインジェクション分析装置により確認した。さらに、キノンより生成する蛍光性分解物は LC-MS, IR 及び ¹H-NMR の測定結果より 3,6-dihydroxyphthalic acid (DHPA) であると同定した。

この反応に基づいて、典型的なキノンである 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ), 1,4-naphthoquinone (1,4-NQ), 9,10-phenanthrenequinone (PQ) 及び 9,10-anthraquinone (AQ) の HPLC 定量法を開発した。4 種類のキノンの分離は ODS カラムとアセトニトリルとイミダゾール緩衝液の混液によるイソクラティック溶離により 25 分以内に完了した。いずれのキノンについても 0.5-100 μM の濃度範囲で発光強度と濃度との間に相関係数 0.998 以上の直線関係が得られた。また、本法によるキノンの検出下限 (S/N=3) は 0.2 – 6 pmol/injection であった。

II. ヒト血漿中ビタミン K 類の HPLC-PO-CL 定量^[2]

上記の測定原理に基づいてヒト血漿中のビタミン K 類 (phyllanthrone (PK), menaquinone-4 (MK-4) 及び menaquinone-7 (MK-7)) の定量法を開発した。ビタミン K 類の定量のために、2-methyl-3-pentadecyl-1,4-naphthoquinone を内標準物質として合成して使用した。本法による PK, MK-4 及び MK-7 の検出下限 (S/N = 3) はそれぞれ 32, 38 及び

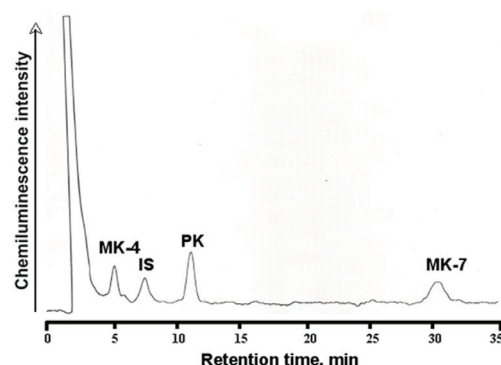


Fig. 2. A chromatogram of plasma extract from a healthy subject spiked with an internal standard.

85 fmol/injection であった。本法により得られる健康人血漿中のビタミン K 類を良好に定量することができた (Fig. 2)。

III. ラット血漿中ドキソルビシン及び代謝物ドキソルビシノールの HPLC-PO-CL 定量^[3]

キノン構造を有する抗腫瘍薬ドキソルビシン (DXR) 及びその代謝物ドキソルビシノール (DXR-ol) の定量法を開発した。DXR 及び DXR-ol は蛍光性を有しており、PO-CL 反応におけるエネルギー受容体となるが、エタノール等の水素供与体存在下では光増感剤としても働き、溶存酸素を過酸化水素へと変換する。従って、紫外線照射後の DXR 及び DXR-ol にシュウ酸エステルのみを混合することで効果的な発光が生じる。この発光を利用する定量法はメタノールによる除タンパクのみという簡便な前処理操

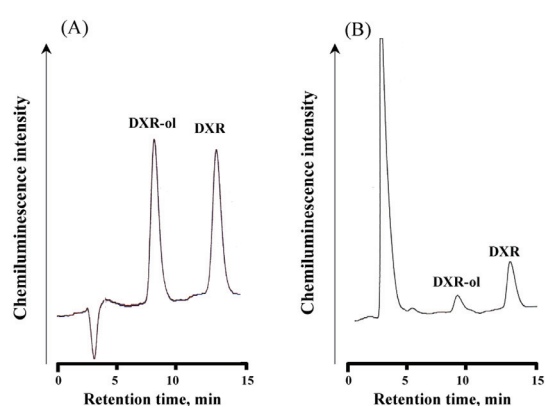


Fig. 3. Chromatograms of (A) a mixture of 500 nM standard DXR and DXR-ol and (B) rat plasma collected after 60 min of single administration of 5 mg/kg DXR.

作で 50 μl の血漿中の DXR 及び DXR-ol を定量可能であった。DXR 及び DXR-ol の検出下限 (S/N=3) は 4.5 及び 3.8 fmol/injection であり、DXR 投与後のラット血漿中の DXR 及び DXR-ol の濃度モニタリングが十分に可能であった (Fig. 3)。

IV. 大気粉じん中キノンの HPLC-luminol-CL 定量法の開発^[4]

環境中に微量に存在するキノンの定量を目的として、新たに紫外線照射を利用するキノンの luminol-CL 定量法を開発した。本法は、キノンに紫外線照射を行うことにより活性酸素種と DHPA が同時に生成することを利用している。興味深いことに、DHPA が luminol-CL 反応での効果的な増強剤として働くことを見出した。紫外線照射により活性酸素と化学発光増強剤が同時に生成する現象はキノンの高選択的な定量に有用である。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推測した。本原理に基づいて、大気中にその存在が見出されている 4 種類のキノン (1,2-NQ, 1,4-NQ, PQ 及び AQ) 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、従来報告されているキノンの定量法と比較して 10-1000 倍高感度であった。本法により、長崎市街地で捕集した大気粉じん中から 4 種類のキノンを良好に定量可能であった (Fig. 4)。

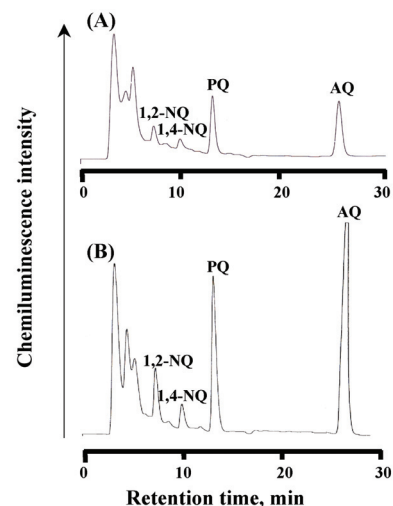


Fig. 4. Chromatograms of the extract from (A) airborne particulates and (B) airborne particulates spiked with 50 nM of a mixture of standard quinones.

【結論】本研究で開発した紫外線照射を利用するキノンの化学発光定量法は生体や環境試料中の微量のキノンの高感度かつ高選択的な定量を可能とし、生体内でのキノンの機能解明や環境中の有害性キノンのモニタリングに有用であると考えられる。

【基礎となった学術論文】

1. Ahmed, S., Fujii, S., Kishikawa, N., Ohba, Y., Nakashima, K., Kuroda, N., *J. Chromatogr. A*, **113**, 76-82 (2006).
2. Ahmed, S., Kishikawa, N., Nakashima, K., Kuroda, N., *Anal. Chim. Acta*, **591**, 148-154 (2007).
3. Ahmed, S., Kishikawa, N., Ohyama, K., Wada, M., Nakashima, K., Kuroda, N., *Talanta*, **78**, 94-100 (2009).
4. Ahmed, S., Kishikawa, N., Ohyama, K., Maki, T., Kurosaki, H., Nakashima, K., Kuroda, N., *J. Chromatogr. A*, in press (2009).