

総合論文

分子内エキシマー蛍光の発現に基づく誘導体化分析法の開発

吉田 秀幸^{®1}, 能 田 均¹, 山口 政俊¹

分子内エキシマー蛍光誘導体化とは、多官能性の被検物質をピレン試薬で多点標識することにより、ピレン通常の蛍光波長（モノマー蛍光；360～420 nm）より長波長域のエキシマー蛍光（440～540 nm）を発することを可能とした誘導体化法のことである。エキシマー蛍光領域で蛍光検出することにより、複数官能基を有する特定化合物のみを選択的に分析することが可能である。一方、試料中の夾雑成分^{きょうざつ}に由来する一点標識体や蛍光性の誘導体化試薬はピレンモノマー蛍光のみを発するので、通常の蛍光誘導体化分析において支障となるこれらからの妨害は受けない。この方法論に基づいて、ポリアミン、ポリフェノール、ポリカルボン酸のような多官能性化合物の分析法を開発し、生理活性化合物、医薬品、環境ホルモンなどの簡便、高感度かつ高選択的な定量を可能とした。本稿では、分子内エキシマー蛍光誘導体化法の原理と、そのバイオメディカル分析科学領域への展開について紹介する。

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（MS）、蛍光、化学発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。この場合、誘導体化が必要である。

誘導体化の大きな目的の一つは、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。それぞれの検出器に応答する誘導体化法・誘導体化試薬が開発されているが、その中で蛍光誘導体化法がはん用され、そのために必要な試薬類も国内外の様々なメーカーから市販されている。

多く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（発蛍光団）が同一分子内に共存している。アクリジン、アントラセン、クマリン、シアニン、ダンシル、フルオレセイン、ローダミン、4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene（BODIPY）、6,7-Dimethoxy-4-methyl-3-oxoquinoxaline-2-carbonyl chloride（DMEQ）、4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole（NBD）など様々な蛍光団が開発されている^{1)~4)}が、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、前処理法や分離技法を改善するだけでなく、無蛍光性の試薬を用いる発蛍光誘導体化法^{5)~7)}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^{8)~10)}が開発^{8)~10)}が試みられている。本稿では、特殊蛍光現象の一つであるエキシマー蛍光を誘導体化分析法に導入することで著者らが成功した「分子内エキシマー蛍光誘導体化法」の原理及び同誘導体化法による生体関連物質（内因性生理活性化合物、医薬品、環境ホルモンなど）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

2.1 エキシマー蛍光

ピレンやアントラセンのような蛍光寿命の比較的長い芳香族蛍光分子が互いに近接して存在するとき、基底状態では安定な二量体を作らないが、一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二量体（excited-state dimer, エキシマー）を形成する。このエキシマーからの発光現象をエキシマー蛍光という（Fig. 1）。エキシマー蛍光は2個の蛍光分子間から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か所の蛍光団の間で生じる分子内エキシマー蛍光とが知られており、前者が高濃度（一般に1 mM以上）溶液中でしか観測されないのに対し、後者は低濃度条件においても観測さ

¹ 福岡大学薬学部: 814-0180 福岡県福岡市城南区七隈 8-19-1

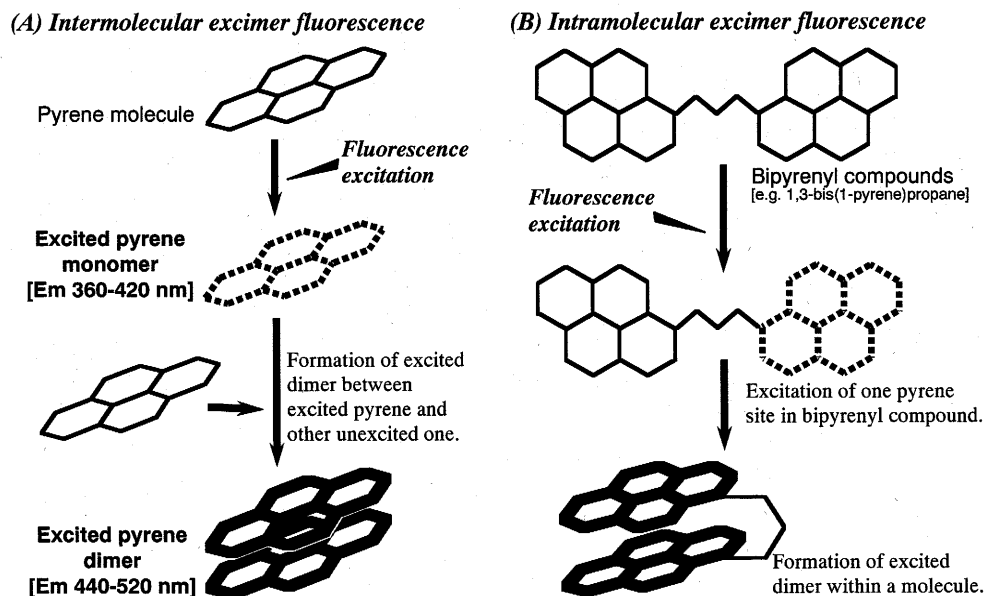


Fig. 1 Schematic diagrams of the production of (A) intermolecular and (B) intramolecular excimer fluorescence of pyrene

(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.

れる。代表的なエキシマー蛍光発現化合物であるピレンの場合、励起光 345 nm を照射すると、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⁾¹¹⁾¹²⁾。このように、エキシマー蛍光はストークスシフトが大きいという、蛍光分析をする上での好ましい蛍光特性がある。

2.2 ピレン蛍光の分析学的利用

前項で記したように、エキシマー蛍光はストークスシフトが大きいという特性を有している。エキシマー蛍光は比較的古くから知られている物理化学的現象であるが、その分析学的な利用は近年になってからのことである。エキシマー蛍光の分析学的な利用として、ピレンエキシマーの優れた蛍光特性により、これまでにタンパク質間相互作用の解析¹³⁾¹⁴⁾や遷移金属イオンの検出¹⁵⁾、核酸のハイブリダイゼーションへの適用¹⁶⁾や三重ラセン構造発現の確認¹⁷⁾などが報告されている。また、膜の溶解の状態を調べるために、ピレン標識された脂肪酸やリン脂質が用いられ、そのエキシマー蛍光が観測されている¹⁸⁾¹⁹⁾。しかしながら、これらの手法はいずれも、エキシマー蛍光とモノマー蛍光の比を測定するレシオメトリックなものであった。

一方、HPLCあるいはキャピラリー電気泳動を分離手段とする様々な化合物の誘導体化分析法が開発され、その誘導体化試薬として多くのピレン試薬が利用されている^{20)~22)}。しかしながら、それらはいずれもピレンモノマ

ー蛍光を検出するものであり、エキシマー蛍光を検出に利用した誘導体化分析法は、これまで皆無であった。

2.3 分子内エキシマー蛍光誘導体化法

著者らは、エキシマー蛍光現象を誘導体化分析に導入することで、従来の蛍光誘導体化法では困難であった対象物質 1 分子当たり 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、そこから発せられるエキシマー蛍光を検出することで、目的化合物の選択的分析が可能となる。つまり、反応液中に過剰に存在する蛍光試薬や試料中に多種多量に共存する単一反応部位のみ有する測定妨害物質（これらはピレンモノマー蛍光のみを発する）の影響は受けない。この分子内エキシマー蛍光誘導体化の原理に基づいて、幾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 フェノールの分析

フェノール化合物は環境や食品中に数多く存在している。その多くはフェノール性水酸基を 1 か所のみ有するモノフェノールであるが、現在では複数のフェノール構造を有するポリフェノール化合物の様々な機能が調べられている。それらポリフェノール類の高感度検出のために従来

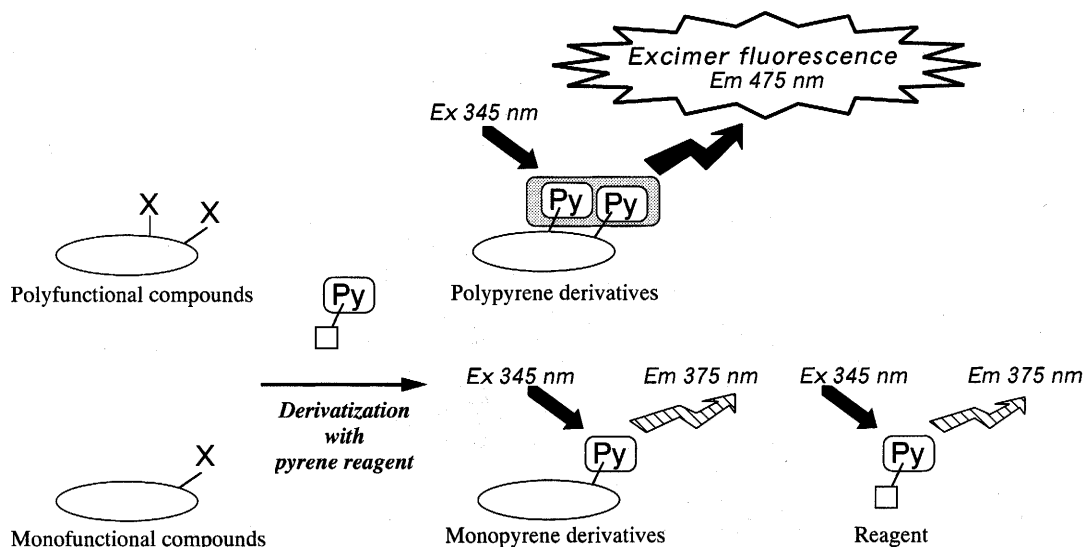


Fig. 2 General concept of intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization with pyrene reagent

By derivatization with pyrene reagent, the polyfunctional compounds can emit the intramolecular excimer fluorescence within a molecule. 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.

の蛍光誘導体化法を適用すると、試料中に共存する多種多量のモノフェノール類も同時に誘導体化されてポリフェノール類と同様の蛍光を与える。したがって、ポリフェノール類の分離・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。そこでポリフェノール分析に 4-(1-pyrene)butanoyl 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²³⁾²⁴⁾。

ビスフェノール A (ポリフェノール化合物) 及び 4-*n*-ニルフェノール (モノフェノール化合物) を PBC で誘導体化し、その反応液について逆相 HPLC で分離、三次元蛍光検出 (励起波長 345 nm) したときのクロマトグラムを Fig. 3 に示す。測定試料に PBC を加え、炭酸カリウムアルカリ性条件下、100℃ での誘導体化反応を行うと、ビスフェノール A 及び 4-*n*-ニルフェノールはそれぞれ 17 分、13 分付近に蛍光性のピークを与えた。ピーク成分の HPLC-MS 分析により、4-*n*-ニルフェノールには 1 か所、ビスフェノール A には 2 か所のフェノール性水酸基それぞれにピレン構造が導入されていることが確認された。また、両ピークの保持時間における蛍光発光スペクトルを確認すると、4-*n*-ニルフェノールは 440 nm より短波長側のピレンモノマー蛍光のみを発しているが、ビスフェノール A はモノマー蛍光だけでなく、440~560 nm にかけてのピレンエキシマー蛍光領域に発光スペクトルを与えた。一方、モノマー蛍光領域で保持時間 3~10 分にかけて検出される試薬成分に由来するピークは、エキシマー蛍光検

出を行うことで比較的小さくなった (誘導体化試薬は極めて高濃度なので、分子間エキシマー蛍光によるピークが出現する)。つまり、エキシマー蛍光検出を行うことで、モノフェノールや試薬成分の妨害を受けることなく、ポリフェノール化合物を選択的に分析することが可能であった²³⁾²⁴⁾。このように、エキシマー蛍光検出の高い選択性に加えて、本法は注入量当たりフェムトモルレベルのポリフェノール検出を可能とする高感度性も有しているため、従来法より簡便な前処理操作のみで微量な試料中のポリフェノール化合物の定量を行うことができる。

3.1 ビスフェノール A

外因性内分泌攪乱化学物質 (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、哺乳瓶溶出液中のビスフェノール A の定量を行った²⁴⁾。塩酸で pH 3 とした哺乳瓶溶出液 (100 ml) に内標準物質を加え、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、未使用未洗浄のポリカーボネート製哺乳瓶から極微量 (ppt レベル) のビスフェノール A の溶出が確認された (Fig. 4A)。一方、同様の操作を行ったガラス製哺乳瓶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)。

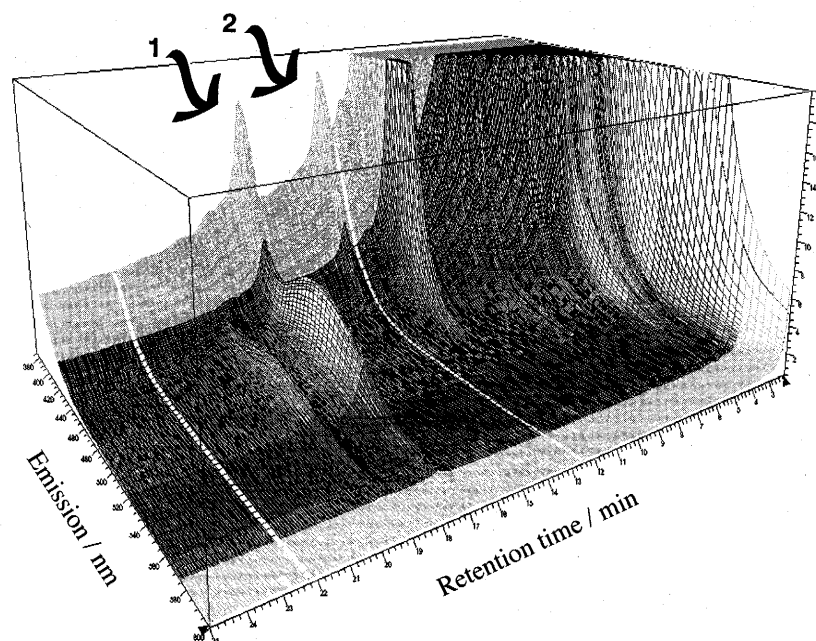


Fig. 3 Three-dimensional fluorescence emission chromatogram obtained with the mixture of pyrene-labeled bisphenol A and 4-*n*-nonylphenol (200 pmol each on column)

The derivatization conditions are as follows: To a standard solution (200 μ l) of phenols (20 nmol/ml in acetonitrile) of (1) bisphenol A and (2) 4-*n*-nonylphenol were added 5 mM PBC (200 μ l in acetonitrile) and 1 M potassium carbonate (10 μ l). After heating at 100°C for 30 min, a 20 μ l portion of the reaction mixture was injected into the chromatograph. The HPLC conditions are as follows: column, TSKgel SuperOctyl (100 $\times$ 4.6 mm I.D., particle size 2 μ m; Tosoh); mobile phase, 75% (v/v) acetonitrile; flow-rate, 1 ml/min; fluorescence excitation, 345 nm. Peaks: 1, bisphenol A; 2, 4-*n*-nonylphenol.

3.2 他のポリフェノール

テトラプロモビスフェノール A は日本国内で最も多量に使用されている臭素系難燃剤成分であり、近年ではヒト血液中からも検出されている²⁵⁾。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、テトラプロモビスフェノール A を含むハロゲン化ビスフェノール化合物の分析法を構築した²⁶⁾²⁷⁾。

4 アミンの分析

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 か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。しかしながら、それらポリアミン類のみを対象とした選択的な分析は極めて困難で、従来は、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 PBC や 4-(1-pyrene)butanoic acid *N*-hydroxysuccinimidyl ester (PSE) を誘導体化試薬とするエキシマー蛍光法を導入し、簡便かつ高選択的な分析手法の開発を行った^{28)~30)}。

4.1 ポリアミン

生体中のポリアミン（ブトレシン、スペルミジン及びスベルミン）及びその誘導体は、がんなどの腫瘍診断における指標の一つとされている。生体にはアミノ酸のようなアミノ基含有化合物が多量に存在しており、通常分析法でポリアミン化合物を選択的に検知することは極めて困難である。そこで、生体ポリアミンのエキシマー蛍光誘導体化-HPLC 分析を行った³⁰⁾。内標準物質を添加後、水で希釈した健常人尿を二分し、一方の試料はそのまま、他方の試料は塩酸で加水分解した。加水分解を行っていない試料と行った試料に PBC でのエキシマー蛍光誘導体化を施し、HPLC 分析したときのクロマトグラムを Fig. 5 に示す。Fig. 5A は加水分解せずに検出される遊離ポリアミンを、Fig. 5B は加水分解操作を経ることで検出された総ポリアミンを分析したクロマトグラムである。これらの定量値 (Fig. 5 脚注) は従来報告されているもの³¹⁾とよく一致しており、本分析法の有用性が実証された。極めて簡便な前処理操作で、pmol/ml 尿レベルのポリアミンが高感度に検出された。

またエキシマー蛍光誘導体化法の有用性に着目し、キャピラリー電気泳動による分離も行われている。カナダ Alberta 大学の Paproski らは、PSE でピレン誘導体化した

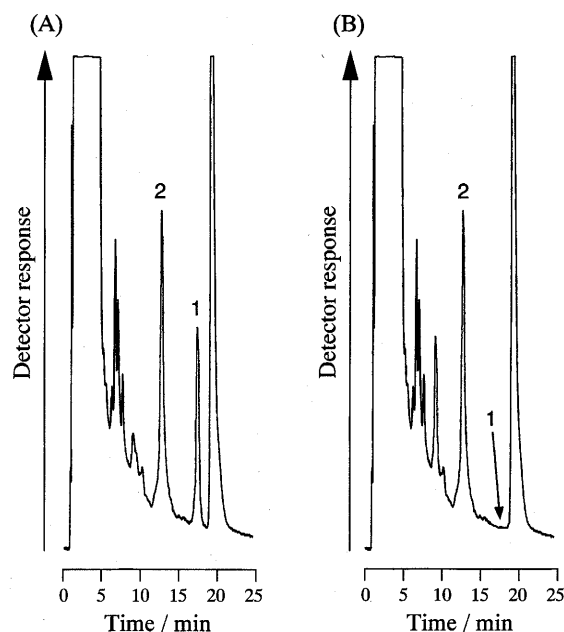


Fig. 4 Chromatograms obtained with the water contacted to the baby bottles made of (A) polycarbonate and (B) glass

The pretreatment procedure is as follows: To a 100 ml portion of water sample, 1.0 ml of 1 M hydrochloric acid for pH adjustment (*ca.* pH 3) and 50 μ l of 1.0 nmol/ml bisphenol F for an internal standard were added. The solution was applied to the Oasis HLB cartridge, and the cartridge was washed with 2 ml of water. After drying for 10 min under vacuum, the compounds in the cartridge were eluted by passing 0.5 ml of methanol four times. All the eluates were combined and evaporated to dryness under a nitrogen stream. To the residue, 200 μ l of 2.5 mM PBC solution and 5 μ l of 1.0 M potassium carbonate were added and vortex-mixed for *ca.* 2 min to redissolve. After heating at 100°C for 30 min, a 20 μ l portion of the reaction mixture was injected into the chromatograph. The HPLC conditions are described in the footnotes of Fig. 3 except detection condition (E_x 345 nm, E_m 475 nm). 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

反応液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ことで、数 nmol/l レベルのポリアミン分析を可能としている³²⁾。

一方、魚介類中のポリアミン類は腐敗に基づく悪臭の原因物質の一つであり、これまでの人の嗅覚に頼った簡易判定法よりも優れた定量的な分析法の開発が望まれていた。米国食品医薬品局 (FDA) の Marks らは、エキシマー蛍光誘導体化法の適用により、極めて簡便な前処理操作のみで魚介類中のプトレシン及びカダベリンを高選択的に分析する方法を報告している³³⁾。一連の分析手順は、ホモジナイズした数 g の魚介類試料からホウ酸とトリクロロ酢酸

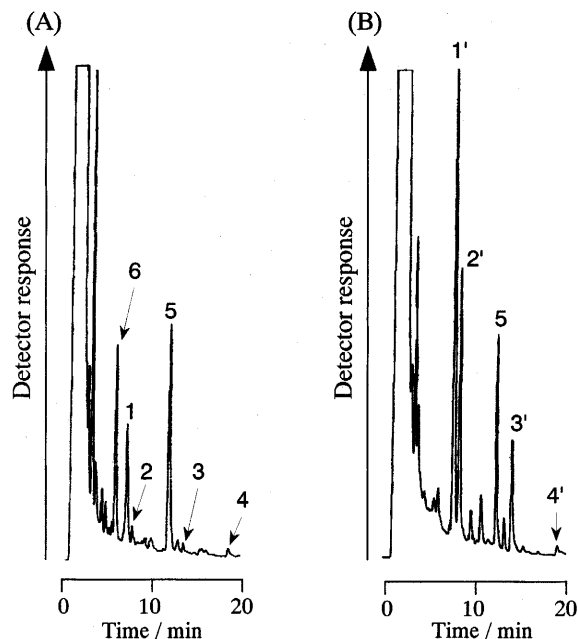


Fig. 5 Chromatograms obtained with healthy human urine sample

The derivatization conditions are as follows: (A), free polyamines; To a 10 times diluted urine sample (200 μ l) were added 5 mM PBC (200 μ l in acetonitrile) and 6 M potassium carbonate (10 μ l). After heating at 80°C for 20 min, 6 M hydrochloric acid (10 μ l) was added, and a 20 μ l portion of the reaction mixture was injected into the chromatograph. (B), total polyamines; A 10 times diluted urine sample (200 μ l) was de-conjugated by heating at 140°C for 6~14 h in the presence of 4 M hydrochloric acid (10 μ l). To a solution were added 5 mM PBC (200 μ l in acetonitrile) and 6 M sodium hydroxide (10 μ l). After heating at 80°C for 20 min, 2 M hydrochloric acid (10 μ l) was added, and a 20 μ l portion of the reaction mixture was injected into the chromatograph. The HPLC conditions are as follows: column, TSKgel SuperOctyl (100 $\times$ 4.6 mm I.D., particle size 2 μ m; Tosoh); mobile phase, linear gradient [0 min, 50% (v/v) acetonitrile; 20 min, 80% (v/v) acetonitrile]; flow-rate, 1 ml/min; fluorescence detection, E_x 345 nm, E_m 475 nm. Peaks and concentrations (nmol/ml urine): 1 and 1', putrescine (3.6 and 15.0); 2 and 2', cadaverine (0.5 and 8.3); 3 and 3', spermidine (0.6 and 6.8); 4 and 4', spermine (0.4 and 0.7); 5, 1,10-diaminodecane (5, added as IS); 6, monoacetylated spermidine and/or spermine; others, urinary endogenous amines and reagent blank components

の混液でアミン成分を抽出し、遠心分離後、PSE で誘導体化、逆相 HPLC で分離、エキシマー蛍光検出するというものである。同分析法により、ツナ缶や生エビ、冷凍サケなどから ppm レベルのプトレシンが検出された。

4.2 他のポリアミン

PSE を用いるエキシマー蛍光誘導体化法をアミノ酸関連

化合物の測定に適用することで、シスチン尿症や高リジン血症患者において尿(血)中濃度が高値を示すオルニチン及びリジンの分析³⁴⁾、アレルギー疾患や潰瘍発症にかかわるケミカルメディエーターであるヒスタミンの分析^{35)~37)}を実施し、いずれもヒト尿1 μ l中に存在するそれら化合物を選択的に定量した。特にヒスタミン分析は神経薬理研究へ展開しており、ラット脳の様々な部位からの微小透析液に含まれるヒスタミンの定量も可能だった³⁸⁾。

更に同誘導体化法の医薬品分析への適用について検討し、1級あるいは2級アミノ基を複数有するトリエンチン³⁹⁾やエタンブロール⁴⁰⁾の高感度・高選択的分析法を構築した。これらの定量法により、薬物投与時の血中濃度モニタリングも可能であった。

4.3 生理活性アミン類

前述したように、PBCはアミノ基だけでなく、フェノール性水酸基のビレン誘導体化も可能である。つまり、同試薬を用いることで、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のエキシマー蛍光誘導体化分析を行うことができる。一段階の誘導体化手順で、上記官能基を2か所以上有する生理活性アミン類(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)がポリピレン標識され、それらを高選択的に検出することができた⁴¹⁾。フェノール性水酸基及びアミノ基いずれにもビレン構造が導入されたことは、反応液のHPLC-MS分析で確認した。

5 カルボン酸の分析

生体には多くのカルボン酸が存在しており、様々な機能を担っている。その多くはカルボキシル基を1か所のみ有するモノカルボン酸であるが、少なからずポリカルボン酸も存在している。これまで、ポリカルボン酸の選択的な分析は難しいものとされているので、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定量法の開発を行った。誘導体化試薬に4-(1-pyrene)butanoic acid hydrazide (PBH)を用いたとき、反応の触媒は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)及びピリジンの組み合わせが最適であった⁴²⁾⁴³⁾。

5.1 ジカルボン酸

5.1.1 グルタル酸尿(血)症診断への適用 ヒト尿中ジカルボン酸は脂肪酸の代謝異常など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、簡便なマススクリーニ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、尿中ジカルボン酸の分析にエキシマー蛍光誘導体化法を適用し、有機酸尿症マススクリーニングのための蛍光スペクトル

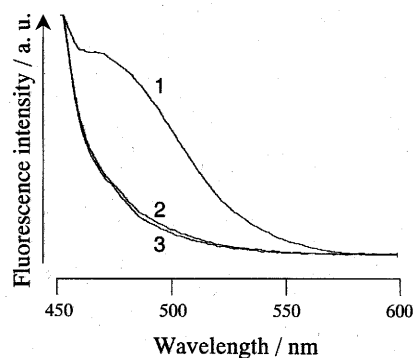


Fig. 6 Fluorescence emission spectra (E_x 345 nm) obtained with the urine samples of (1) the patient with glutaric aciduria type II and (2) healthy person

The standard procedure is as follows: To a 10 times diluted urine sample (200 μ l) were added 40% (v/v) pyridine (100 μ l in dimethylsulfoxide), 0.2 M EDC (100 μ l), and 5 mM PBH (200 μ l in dimethylsulfoxide). After heating at 40°C for 60 min, a 10000 times diluted reaction mixture with 50% (v/v) tetrahydrofuran was measured by spectrofluorometry (E_x 345 nm). The total concentrations of dicarboxylic acids were calculated as adipic acid. Samples and concentrations (μ mol/ml urine): 1, sample 1 in Table 1 (10.7); 2, sample 2 in Table 1 (0.38); 3, blank

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。以下にグルタル酸尿症診断への適用例⁴⁴⁾について説明する。

(1) 蛍光スペクトル分析(マススクリーニング) 尿中には種々のジカルボン酸類が存在している。EDC及びピリジンの存在下、尿試料をビレン試薬で誘導体化し、反応液のエキシマー蛍光強度を計測することにより、添加した試薬や尿中に存在する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た。II型グルタル酸尿症患者及び健康人の尿試料から得られた蛍光発光スペクトルをFig. 6に示す。総ジカルボン酸量(アジピン酸換算)は、それぞれ10.7及び0.38 μ mol/ml尿であった。患者尿中の総ジカルボン酸量は健康人尿の数十倍に及ぶので、反応液のスペクトル分析を行うことで、有機酸尿症の簡便なマススクリーニングが可能であった。

(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、HPLCを利用して各ジカルボン酸の分別定量を行った。先ほどと同一の尿試料をHPLC分析したところ、グルタル酸、アジピン酸、スベリン酸及びセバシン酸が分離・検出され、いずれもnmol/ml尿レベルまで高感度に定量された(Fig. 7)。HPLC分析における4種ジカルボン酸濃度の積算値と蛍光スペクトル分析で算出したジカルボン酸総量の概算値は、II型グルタル酸尿症患者尿の場合も健康人の場合もほぼ同程度の値であった。

(Table 1). これらの結果は本誘導体化法を行うことで、蛍光スペクトル分析での簡便・迅速な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、本法が有機酸尿症の診断に極めて有効であると期待される。

一方、サウジアラビア King Faisal 専門病院・研究センターの Al-Dirbashi らは、エキシマー蛍光誘導体化の原理に基づいてグルタル酸と 3-ヒドロキシグルタル酸の同時 HPLC 定量法を開発し、I 型グルタル酸血症患者を含む多検体の乳幼児尿試料を分析した⁴⁵⁾。5 年間以上凍結保存さ

れていた患者尿試料からも両化合物が検出・定量され、本法が I 型グルタル酸血症の過渡的診断にも利用できることが示された。

5・1・2 メチルマロン酸血症診断への適用 メチルマロン酸血症は、メチルマロン酸が体内に蓄積し、生命の危険に及ぶ重症のアシドーシスやケトーシスを起こす一種の遺伝性代謝異常症である。前出の Al-Dirbashi らはマロン酸を内標準物質とするメチルマロン酸のエキシマー蛍光誘導体化-HPLC 定量法を構築し、ヒト尿中及び乾燥汚紙血に含まれる同酸の分析を行った⁴⁶⁾⁴⁷⁾。3.2 mm 四方の乾燥汚紙血からメタノール抽出されたメチルマロン酸をエキシマー蛍光定量すると、メチルマロン酸血症患者とプロピオン酸血症患者の血中濃度には有意な差が認められた。従来のメチルマロン酸血症の診断指標であったアシルカルニチンと異なり、メチルマロン酸自体は極めて安定性が高いので、エキシマー蛍光誘導体化法は長期間保存されている試料の過渡的分析にも十分適用できるものと期待される。

5・2 他のジカルボン酸

PBH を誘導体化試薬とするエキシマー蛍光誘導体化法により、酸性アミノ酸類（グルタミン酸、アスパラギン酸及び *N*-メチルアスパラギン酸）の分析も可能であった⁴⁸⁾。この方法は他のアミノ酸の妨害を受けない選択的定量法であり、各酸性アミノ酸の検出限界は注入量当たり数十フェムトモルレベルであった。

6 ま と め

分子内エキシマー蛍光誘導体化法は高い選択性と高感度性を併せ持つ極めて実用的な蛍光誘導体化手段である。そのため、微量試料を簡単な前処理操作のみで分析することができる。本誘導体化法のフェノール、アミン及びカルボン酸以外の他の化合物群への適用とともに、開発された各方法論がこれまで以上に医療、生化学、環境、食品などの分野へ実用化されていくことを期待する。

本研究に、ご協力、ご支援いただきました福岡大学医学部の廣瀬伸一助教授、国際医療福祉大学薬学部の吉武 尚助教授、佐賀

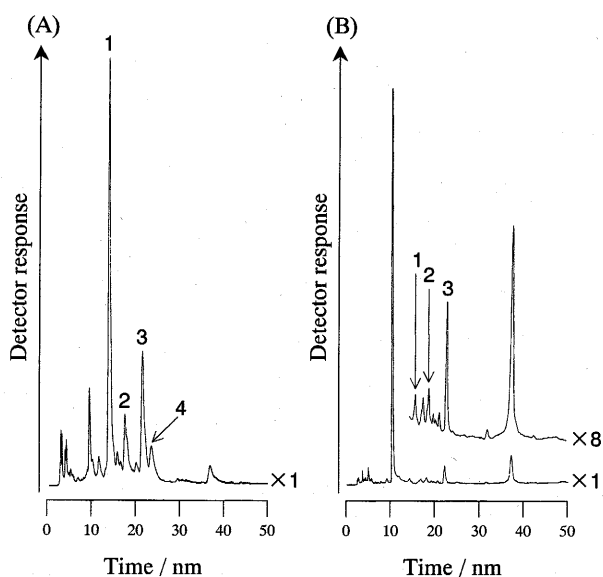


Fig. 7 Chromatograms obtained with the urine samples of (A) the patient with glutaric aciduria type II (sample 1 in Table 1) and (B) healthy person (sample 2 in Table 1)

The derivatization conditions are described in the footnotes of Fig. 6. The HPLC conditions are as follows: column, YMC-Pack ODS-AM (250 × 4.6 mm I.D., particle size 5 µm; YMC); mobile phase, 67% (v/v) acetonitrile; flow-rate, 1 ml/min; fluorescence detection, E_x 345 nm, E_m 475 nm. Peaks: 1, adipic acid; 2, suberic acid; 3, glutaric acid; 4, sebacic acid; others, reagent blanks and unknowns. Concentrations: see Table 1

Table 1 Concentration (nmol/ml urine) of dicarboxylic acids

Sample	HPLC method for individual determination					Spectrofluorometric measurement ^{c)} (mean ± S.D., n = 3)
	Adipic acid	Glutaric acid	Suberic acid	Sebacic acid	Sum	
1 ^{a)}	5200	2100	870	2100	10270	10700 ± 830
2 ^{b)}	70	230	120	<1	420	380 ± 28
3 ^{b)}	71	88	84	<1	243	240 ± 18
4 ^{b)}	66	330	130	<1	526	460 ± 38

a) The patient with glutaric aciduria type II (sex unknown, 0 year). b) Healthy person (male, 22~24 years). c) The amount was estimated as adipic acid concentration.

大学医学部付属病院薬剤部の中野行孝博士、浜松ホトニクスの中園 浩博士、化学物質評価研究機構の一瀬文雄博士、福岡大学薬学部の轟木堅一郎、数田朝子、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、有川聡平、常友盛勝、木戸史人、原口将之の諸氏に深く感謝します。

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金により遂行された。

(2005年9月、日本分析化学会第54年会の奨励賞受賞講演において一部発表)

文 献

- 1) Y. Ohkura, M. Kai, H. Nohta: *J. Chromatogr. B*, **659**, 85 (1994).
- 2) M. Yamaguchi, J. Ishida: "Modern derivatization methods for separation sciences", T. Toyo'oka (Ed.), p. 99 (1999), (John Wiley and Sons Ltd, New York).
- 3) K. Fukushima, N. Usui, Y. Santa, K. Imai: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1655 (2003).
- 4) "Molecular Probes" in Invitrogen Web Site. <<http://probes.invitrogen.com/>>, [accessed January 2006].
- 5) S. Uchiyama, T. Santa, K. Imai: *Anal. Chem.*, **73**, 2165 (2001).
- 6) K. Gyimesi-Forras, A. Leitner, K. Akasaka, W. Lindner: *J. Chromatogr. A*, **1083**, 80 (2005).
- 7) T. Yoshitake, J. Kehr, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi: *Biomed. Chromatogr.*, **20**, 267 (2006).
- 8) 阿部一智, 石田淳一, 中村 優, 山口政俊: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 555 (1995).
- 9) K. Matsumoto, Y. Tsukahara, T. Umehara, K. Tsunoda, H. Kume, S. Kawasaki, J. Tadano, T. Matsuya: *J. Chromatogr. B*, **773**, 135 (2002).
- 10) M. Yoshitake, H. Nohta, H. Yoshida, T. Yoshitake, K. Todoroki, M. Yamaguchi: *Anal. Chem.*, **78**, 920 (2006).
- 11) T. Förster: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **8**, 333 (1969).
- 12) S. S. Lehrer: *Method. Enzymol.*, **278**, 286 (1997).
- 13) S. L. Betcher-Lange, S. S. Lehrer: *J. Biol. Chem.*, **253**, 3757 (1978).
- 14) Y. Ishii, S. S. Lehrer: *Biochemistry*, **26**, 4922 (1987).
- 15) B. Bodenant, F. Fages: *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1451 (1995).
- 16) K. Ebata, M. Masuko, H. Ohtani, M. Kashiwasake-Jibu: *Photochem. Photobiol.*, **62**, 836 (1995).
- 17) S. Mohammadi, A. Slama-Schwok, G. Leger, D. E. Monouni, A. Shchyolkina, Y. Leroux, E. Taillandier: *Biochemistry*, **36**, 14836 (1997).
- 18) D. E. Yarger, C. B. Patrick, S. I. Rapoport, E. J. Murphy: *J. Neurosci. Methods*, **100**, 127 (2000).
- 19) P. Somerharju: *Chem. Phys. Lipids*, **116**, 57 (2002).
- 20) N. Nimura, T. Kinoshita, T. Yoshida, A. Uetake, C. Nakai: *Anal. Chem.*, **60**, 2067 (1988).
- 21) F.-T. A. Chen, R. A. Evangelista: *Anal. Biochem.*, **230**, 273 (1995).
- 22) L. A. Lidnour, R. A. Ercal, N. Ercal, D. R. Spitz: *Method. Enzymol.*, **299**, 258 (1999).
- 23) 能田 均, 吉田秀幸, 山口政俊: 日本特許公開公報, 2001-165859 (2001. 6. 22).
- 24) H. Yoshida, H. Harada, H. Nohta, M. Yamaguchi: *Anal. Chim. Acta*, **488**, 211 (2003).
- 25) C. Thomsen, K. Janak, E. Lundanes, G. Becher: *J. Chromatogr. B*, **750**, 1 (2001).
- 26) H. Yoshida, S. Tsunetomo, T. Hayama, K. Todoroki, H. Nohta, H. Kuroki, M. Yamaguchi: *Organoharogen Compd.*, **66**, 305 (2004).
- 27) 常友盛勝, 吉田秀幸, 轟木堅一郎, 巴山 忠, 能田 均, 黒木広明, 山口政俊: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53**, 1501 (2004).
- 28) 里園 浩, 能田 均: 日本特許公開公報, 平 10-142228 (1998. 5. 29).
- 29) H. Nohta, H. Satozono, K. Koiso, H. Yoshida, J. Ishida, M. Yamaguchi: *Anal. Chem.*, **72**, 4199 (2000).
- 30) H. Yoshida, H. Harada, Y. Nakano, H. Nohta, J. Ishida, M. Yamaguchi: *Biomed. Chromatogr.*, **18**, 687 (2004).
- 31) D. Teti, M. Visalli, H. McNair: *J. Chromatogr. B*, **730**, 107 (2002).
- 32) R. E. Paproski, K. I. Roy, C. A. Lucy: *J. Chromatogr. A*, **946**, 265 (2002).
- 33) H. S. Marks (Rupp), C. R. Anderson: *J. Chromatogr. A*, **1094**, 60 (2005).
- 34) H. Yoshida, Y. Nakano, K. Koiso, H. Nohta, J. Ishida, M. Yamaguchi: *Anal. Sci.*, **17**, 107 (2001).
- 35) 山口政俊, 能田 均, 吉田秀幸, 吉武 尚, 一瀬文雄: 日本特許公開公報, 2001-242174 (2001. 9. 7).
- 36) T. Yoshitake, F. Ichinose, H. Yoshida, K. Todoroki, J. Kehr, O. Inoue, H. Nohta, M. Yamaguchi: *Biomed. Chromatogr.*, **17**, 509 (2003).
- 37) H. Yoshida, F. Ichinose, T. Yoshitake, Y. Nakano, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi: *Anal. Sci.*, **20**, 557 (2004).
- 38) T. Yoshitake, M. Yamaguchi, H. Nohta, F. Ichinose, H. Yoshida, S. Yoshitake, K. Fuxe, J. Kehr: *J. Neurosci. Methods*, **127**, 11 (2003).
- 39) Y. Nakano, H. Nohta, H. Yoshida, T. Saita, H. Fujito, M. Mori, M. Yamaguchi: *J. Chromatogr. B*, **774**, 165 (2002).
- 40) Y. Nakano, H. Nohta, H. Yoshida, T. Saita, H. Fujito, M. Mori, M. Yamaguchi: *Anal. Sci.*, **20**, 489 (2004).
- 41) H. Yoshida, H. Nohta, Y. Harada, M. Yoshitake, K. Todoroki, M. Yamaguchi: *J. Chromatogr. B*, **821**, 88 (2005).
- 42) 能田 均, 里園 浩, 園田純一郎, 吉田秀幸, 山口政俊: 日本特許公開公報, 平 11-281578 (1999. 10. 15).
- 43) H. Nohta, J. Sonoda, H. Yoshida, H. Satozono, J. Ishida, M. Yamaguchi: *J. Chromatogr. A*, **1010**, 37 (2003).
- 44) H. Yoshida, J. Araki, J. Sonoda, H. Nohta, J. Ishida, S. Hirose, M. Yamaguchi: *Anal. Chim. Acta*, **534**, 177 (2005).
- 45) O. Y. Al-Dirbashi, M. Jacob, Z. Al-Hassnan, F. El-Badaoui, M. S. Rashed: *Clin. Chem.*, **51**, 235 (2005).
- 46) O. Y. Al-Dirbashi, M. Jacob, M. Al-Amoudi, K. Al-Kahtani, A. Al-Odaib, F. El-Badaoui, M. S. Rashed: *Clin. Chim. Acta*, **359**, 179 (2005).
- 47) O. Y. Al-Dirbashi, M. Jacob, Z. Al-Hassnan, R. W. Chabayta, F. El-Badaoui, M. S. Rashed: *Biomed. Chromatogr.*, **20**, 54 (2006).
- 48) 吉田秀幸, 堀田佳代子, 轟木堅一郎, 能田 均, 山口政俊: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 1113 (2003).

Highly Selective Derivatization Method Based on Intramolecular Excimer-Forming Fluorescence

Hideyuki YOSHIDA¹, Hitoshi NOHTA¹ and Masatoshi YAMAGUCHI¹

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

(Received 1 January 2006, Accepted 7 February 2006)

A highly selective and sensitive method with 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 reversed-phase liquid chromatography. Polyamines, polyphenols, and polycarboxylic acids, having two or more reactive functional groups in a molecule, were converted to the corresponding polypyrene-labeled derivatives by a reaction with an appropriate pyrene reagent. These derivatives afforded intramolecular excimer fluorescence (440~520 nm), which can clearly be discriminated from the monomer (normal) fluorescence (360~420 nm) emitted from pyrene reagents and monopyrene-labeled derivatives of monofunctional compounds coexisting in the samples. By intramolecular excimer fluorescence detection, highly selective and sensitive determinations of polyamines including histamine and basic amino acids, polyphenols, and polycarboxylic acids including acidic amino acids could be achieved. Furthermore, the methods were successfully applied to the determination of various biological and environmental substances in real samples, which required only a small amount of samples and a simple pretreatment.

Keywords : excimer fluorescence; fluorescence derivatization; liquid chromatography; spectrofluorometry; pyrene.