

2015 年度 日本分析化学会・フローインジェクション分析研究懇談会 フローインジェクション分析学術賞

黒田 直 敬 君

Naotaka KURODA

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科教授

1958 年 7 月生まれ（本籍地：長崎県）。1981 年九州大学薬学部卒業。1986 年九州大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。1986 年福岡県赤十字血液センター入社。1991 年長崎大学薬学部助手（保健衛生薬学講座）、1996 年同助教授、1999 年同教授、2002 年長崎大学大学院医歯薬学総合研究科教授（生命薬科学専攻）、現在に至る。日本分析化学会九州支部幹事、日本臨床化学会学術担当理事、日本法中毒学会評議員、Chem. Pharm. Bull. 編集委員などを歴任。



【業績】

化学発光検出を利用するフロー分析法の開発と応用

化学発光（CL）検出法は、高感度な検出法である蛍光検出法と比較しても、さらに高感度な検出法として知られている。すなわち、CL 検出では物質を励起するための光源を必要としないことから、光源に由来する迷光やラマン光などが観測されず、また、光源の変動も無いことから高いシグナル/ノイズ比が得られる。さらに、検出器も構造が簡易で、比較的安価である。一方で、CL 反応は温度や溶媒など環境の影響を受けやすく、これが精度の低下を招く原因ともなっている。

黒田直敬君は、このような CL 法の特徴に着目し、化学反応の制御が容易なフロー分析と組み合わせることで、高感度かつ高精度な分析法を開発し、医薬品、食品や生体試料分析等に適用してきた。また、フロー分析にオンライン紫外線照射など独創的な手法を導入することで、フロー分析/CL 検出法の適用範囲を広げる試みも報告している。以下に、これらの研究の概要を紹介する。

1) 固定化酵素カラムリアクターを導入した化学発光検出 FIA 法の開発と応用^{1)~3)}

過シュウ酸エステル CL は、シュウ酸エステル、 H_2O_2 及び蛍光物質の反応で生じる発光である。従って、反応効率の優れたシュウ酸誘導体と量子収率の高い蛍光物質を組み合わせることで、 H_2O_2 の高感度検出が可能となる。そこで、 H_2O_2 の発生を伴う酵素を固定化したカラムリアクターを組み込んだ FIA 装置を構築し、これらの基質となるコリン含有リン脂質や D-アミノ酸の FIA 法を開発した。これらの方法は高感度であり、ヒト血液試料に適用できた。また、 H_2O_2 の高感度 FIA 法を食品中の菌由来のカタラーゼ活性測定に応用し、食品の微生物汚染の簡便な評価法を確立することができた。

2) 活性酸素消去能評価を目的とした化学発光検出 SIA 及び FIA 法の開発と応用^{4)~11)}

活性酸素種（ROS）は反応性に富む酸素分子種の総称であり、 1O_2 、 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 などが知られている。生体内で ROS は殺菌作用を示すが、過剰の ROS は癌、糖尿病などの疾患や老化の促進などにも関与する。そのため、ROS 消去物質に注目が集まっているが、特定の ROS に対する消去能の簡便で迅速な測定は容易ではなかった。一方、ルミノールはほとんど全ての ROS と反応して発光を生じることから、各 ROS の発生系とフロー分析とを組み合わせることで、同一発光試薬を用いて、試料の ROS 消去能の迅速な分析が可能となる。そこで、各 ROS に対するシーケンシャルインジェクション分析（SIA）法を構築し、さらに、複数の ROS の消去

能を連続的に評価できる SIA 装置を考案した。開発された方法は、迅速かつ簡便に薬剤、機能性食品や生体試料の ROS 消去能を測定することが可能であり、化合物の ROS 消去能評価あるいは生体の酸化ストレス評価の研究に有用な手段となることが期待される。

一方、FIA 法においても、試料と試薬消費量の低減を目的にシステムのセミマイクロ化を図った。ここで開発した方法は、抗酸化物質の動物への影響を調べるためにラットの血液や脳の微小透析液試料に応用され、抗酸化物質の生体影響評価にも有用なことが示された。

3) 紫外線照射による活性酸素発生を利用する化学発光検出 FIA 法の開発と応用^{12), 13)}

有機過酸化物に紫外線を照射すると H_2O_2 が発生する現象を利用し、これとルミノール CL とを組み合わせることで、過酸化物の高感度なフロー分析法を構築した。フローシステムの流路に紫外線ランプとこれに巻き付けた反応コイルを組み込むことで、 H_2O_2 への効率的な変換条件の最適化を行った。最終的には H_2O_2 と複数の有機過酸化物の HPLC による分離定量を目的としたが、FIA 法で測定条件の最適化を行うとともに、カタラーゼを固定化したカラムリアクターを FIA 装置に組み込むことで、各有機過酸化物からの H_2O_2 の発生を確認することができた。最終的に確立した HPLC 法は有機過酸化物に選択的であり、小麦粉中の漂白剤の定量にも応用されたほか、ペルオキシ構造を有する医薬品アルテミシニンの定量にも適用することができた [Biomed. Chromatogr., **20**, 1157-1162 (2006)]。

亜硝酸アミルも過酸化物と同様にオンラインフォトリアクターを組み込んだ FIA システムで発光を示す。この場合、反応に関わる ROS は NO および ONOO⁻と考えられるが、0.03 μM の亜硝酸アミルを検出できた。この感度は、蛍光法に比べ約 100 倍高感度で、医薬品の定量にも適用可能であった。

以上の研究業績は、フロー分析の利点を CL 法に巧みに導入した分析法の確立に関わるものであり、CL 法自体が持つ高感度性、高選択性に加え、医薬品や生体成分等に対する高い精度を伴う実用的なフロー分析法を提案するものであり、FIA 研究の発展に寄与するところ顕著なものがある。

（フローインジェクション分析褒賞委員会）

文献

[1] J. Chromatogr. B, **678**, 129-136 (1996). [2] Anal. Sci., **13**, 945-950 (1997). [3] 分析化学, **51**, 123-126 (2002). [4] 分析化学, **53**, 925-930 (2004). [5] Anal. Sci., **22**, 73-76 (2006). [6] Anal. Bioanal. Chem., **388**, 1809-1814 (2007). [7] Clin. Chim. Acta, **411**, 1111-1115 (2010). [8] 分析化学, **55**, 931-936 (2006). [9] Luminescence, **26**, 191-195 (2011). [10] Food Chem., **134**, 546-552 (2012). [11] Luminescence, in press (2015). [12] J. Chromatogr. A, **987**, 189-195 (2003). [13] Luminescence, **29**, 8-12 (2014).