ノ ー ト

ポリビニルアルコールを基質とした固体基質室温りん光法 によるセロトニン、トリプタミン、グラミンの分析

北出 達也^{®*}, 八木原夏子*, 梶本 晃司*, 北村 桂介*

Determination of serotonin, tryptamine, and gramine by solid-substrate room-temperature phosphorimetry on a poly(vinyl alcohol) substrate

Tatsuya KITADE, Natsuko YAGIHARA, Koji KAJIMOTO and Keisuke KITAMURA*

*Kyoto Pharmaceutical University, 5, Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414

(Received 22 December 1997, Accepted 12 March 1998)

An easy and sensitive method for the determination of serotonin (5-HT), tryptamine (Try) and gramine (Gra) was developed by using solid-substrate room-temperature phosphorimetry on a poly (vinyl alcohol) substrate. The method did not require a dry gas flush during the measurement of phosphorescence. The phosphorescence intensities of the compounds were enhanced by using a NaOH solution {water-ethanol, 50 : 50 (v/v)} as the solvent, and potassium iodide and sodium dodecyl sulfate as enhancers. The order of spotting phosphor and enhancers onto the substrate also affected the phosphorescence intensity. The analytical figures of merit for these three compounds were as follows. The linear dynamic ranges of 5-HT, Try and Gra were 5~500, 2.5~250 and 2.5~250 pmol/spot (5 μ l), respectively. The correlation coefficients of the calibration curves were over 0.991 and the relative standard deviations at 50 pmol/spot (5 μ l) varied from 5.0 to 6.5%, showing a good precision of the proposed method.

Keywords : serotonin; tryptamine; gramine; room-temperature phosphorimetry; poly (vinyl alcohol).

1 緒 言

トリプトファン由来のインドールアルキルアミンであるセロトニン (5-HT) は、平滑筋や血管の収縮など様様な作用を有している。5-HT の血中濃度は血小板減少症及び増加症では低下し、カルチノイドにおいては増加する。よって、これらの疾病に対する診断法として血中 5-HT 濃度を測定することは臨床学的に有意義である。現在、5-HT の定量分析法には HPLC 法¹⁾²⁾、蛍光法³⁾⁴⁾、

ラジオイムノアッセイ法^{5)~7)}、ラジオエンザイマティックアッセイ法⁸⁾⁹⁾等があるが、いずれの方法も操作が煩雑で測定に時間を要する。従って、5-HT の簡便な定量分析法の開発が要求されている。これまで 5-HT に対して汭紙を固体基質とした室温りん光法により分析を試みた報告はあるが¹⁰⁾、汭紙を基質とした場合、かなり煩雑な汭紙のバックグラウンドシグナル除去操作が必要である、酸素、水により消光するために測定中、試料室に乾燥不活性ガスを流し続けなければならない、汭紙の種類によって性能が異なるなどの欠点を有しており、簡便な分析法とは言えない。

* 京都薬科大学: 607-8414 京都府京都市山科区御陵中内町 5

Fig. 1 RTP emission spectra of serotonin, tryptamine, gramine and background signal
A: serotonin ($\lambda_{ex} = 283$ nm); B: tryptamine ($\lambda_{ex} = 285$ nm); C: gramine ($\lambda_{ex} = 282$ nm); D: background (water-ethanol (50 : 50, v/v)) ($\lambda_{ex} = 289$ nm); Compounds: 500 pmol/spot; Solvent : water-ethanol (50 : 50, v/v)

一方、ポリビニルアルコール (PVA) を基質とした固体基質室温りん光法 (SS-RTP) は、従来の濾紙を基質とした方法と比較してバックグラウンドの除去操作及び試料室への乾燥不活性ガスの導入が不要である、製品間の性能が一定である、などの利点を有する高感度かつ簡便な分析方法であり、既にフェノチアジン系薬物の定量分析への応用等が報告されている^{(11)~(13)}。

そこで 5-HT、同じくトリプトファン由来のインドールアルキルアミンであるトリプタミン (Try)、グラミン (Gra) に対して本法を適用し、これらのより簡便な SS-RTP による分析法の開発を行った。

2 実験

2.1 試薬

基質素材として PVA: 重合度 2000, けん化度 78~82 mol%, 一級 (関東化学), 発りん光性物質として S-HT 塩酸塩, 塩酸 Try: 特級, Gra: 特級 (以上, 東京化成), 液性調製試薬として塩酸: 精密分析用, 水酸化ナトリウム: 特級 (以上, 関東化学) を使用した。又, 増感剤としてドデシル硫酸ナトリウム (SDS): 一級, ヨウ化カリウム: 特級, 硝酸銀: 特級, 塩化ユウロピウム (III) 六水和物 (以上, 関東化学), 臭化カリウム: 特級, 酢酸鉛三水和物: 特級 (以上, 半井化学薬品), 塩化ブラセオジウム (三津和化学薬品), 塩化ジスプロシウム六水和物 (和光純薬) を使用した。なお, すべての試薬は購入

時の状態で使用した。

溶媒として発りん光性物質はエタノール: 特級 (関東化学) を用いた, 水-エタノール (50 : 50, v/v) 混合溶液を, 増感剤には水を使用した。水 291 は超純水製造装置 (Milli-Q Labo, Millipore) より得られた超純水を使用した。

2.2 装置

基質の加圧成形には赤外吸光分析用 KBr 錠剤成形器とハンドプレス (島津製作所) を使用した。りん光測定にはりん光付属装置を装着した F-3010 型分光蛍光光度計 (日立製作所) を使用した。

2.3 基質の調製

PVA を電動ミルで粉碎後, ふるいを用いて 63 μ m 以下の粉末を採取した。この粉末 50 mg を KBr 錠剤成形器とハンドプレスを用いて (打錠圧 4 t, 打錠時間 1 分) 直径 13 mm, 厚さ約 1 mm の円盤状の錠剤に加圧成形した。この錠剤の片面をセロハンテープで補強した後, 4×8 mm の小片に切断し 30×8 mm に切断したポリエステルフィルムシートに両面テープではり付けた。

2.4 測定操作

増感剤を使用した場合には増感剤の水溶液を各々 5 μ l 使用しなかった場合には同量の水をマイクロシリンジで

基質表面に滴下し, 次いで試料溶液 5 μ l を滴下後, 市販の電子レンジ (500 W) で 4 分間乾燥させた. 引き続き, 既報のスピンドル型試料ホルダー¹³⁾に基質をはり付け, 分光光度計の試料室に挿入し, 乾燥不活性ガスを導入することなくりん光測定を行った.

3 結果と考察

3.1 5-HT, Try, Gra のりん光特性

5-HT, Try, Gra 及びバックグラウンドの最大励起波長におけるりん光スペクトルを Fig. 1 に示す. 5-HT ($\lambda_{\text{max, ex}} = 283$, $\lambda_{\text{max, em}} = 454$ nm), Try ($\lambda_{\text{max, ex}} = 285$, $\lambda_{\text{max, em}} = 440$ nm), Gra ($\lambda_{\text{max, ex}} = 282$, $\lambda_{\text{max, em}} = 438$ nm) とほぼ同じ領域に強度は弱いがりん光が観測され, 発りん光性があることが確認でき, 本法でも汙紙を基質とした場合¹⁰⁾と同様に 5-HT, Try, Gra の分析が行える可能性があることが分かった. 又, 溶媒として用いた水-エタノール混合溶媒中の水に含有される発りん光性物質のために, バックグラウンドシグナルに微弱ではあるがりん光が観測された. 分析対象物質の濃度が極端に低く, 観測されるりん光強度が微弱な場合はバックグラウンドの影響は免れないが, 本研究においてはこの程度のバックグラウンド強度であれば影響はないと考えられるので無視した.

3.2 増感法の開発

Fig. 1 に示したように 5-HT, Try, Gra 共に発りん光性を示したが, りん光強度が微弱であるためりん光強度を増強させる必要がある. そこで増感剤として既に汙紙基質でその増感効果が確認されている KI と SDS を選¹⁰⁾, それらの PVA 基質における増感効果の有無について検討を行った. その結果, 3 物質共に増感剤無添加では微弱であったりん光強度が, KI を添加することによって飛躍的に増強された. 更に SDS を添加すると再現性は劣るがりん光強度が増強される傾向が認められ, PVA 基質でも汙紙基質と同じく KI と SDS に増感作用があることが分かった.

そこで最適な KI 添加量について検討を行うために, KI の量を段階的に変えて添加したときの 5-HT, Try, Gra のりん光強度の経時変化測定を行った. その結果を Fig. 2 に示す. 3 物質共に添加した KI の量の増加とともに最大りん光強度は強くなった. しかし, 添加する KI の量が増加するに従って基質表面層に KI が過剰に存在し, それが吸湿することによって PVA 基質の特性の一つであるりん光強度の経時的安定性が失われ, りん光強度が急速に減衰するようになった. そこで測定開始後約

Fig. 2 Time courses of RTP signals of serotonin, tryptamine and gramine in the presence of different amounts of potassium iodide

A: serotonin; B: tryptamine; C: gramine; Compounds: 500 pmol/spot (serotonin, tryptamine), 50 pmol/spot (gramine); Solvent: water-ethanol (50 : 50, v/v); Potassium iodide (μ mol/spot): a 5.0, b 4.0, c 3.0, d 2.5, e 2.0, f 1.0

10 分間, りん光強度がほとんど変化せず, PVA 基質の特性であるりん光強度の経時的安定性を保っている 2.0 μ mol/spot を最適 KI 添加量とした.

添加する SDS の量について検討したところ, 5-HT,

Table 1 Effect of HCl or NaOH concentration on the RTP intensity of serotonin, tryptamine, gramine

Solvent		RTP intensity		
Reagent	Concentration/mol l ⁻¹	Serotonin	Tryptamine	Gramine
HCl	1.0	6.88	7.23	1.02
	1.0×10^{-1}	52.8	83.6	14.2
	1.0×10^{-2}	48.1	73.8	32.8
	1.0×10^{-4}	39.4	52.3	31.0
None	—	36.1	49.9	27.3
NaOH	1.0×10^{-4}	35.0	61.8	29.3
	1.0×10^{-2}	27.7	54.9	29.2
	1.0×10^{-1}	51.5	64.0	53.1
	1.0	77.8	107	94.4
	2.0	18.6	34.9	39.2

Compounds: 5 nmol/spot; Solvent: water-ethanol (50 : 50, v/v) mixture containing various amounts of hydrogen chloride or sodium hydroxide; $N=3$

Table 2 Effect of order of spotting phosphor and enhancers onto PVA substrate on the RTP intensity

Order of spotting reagents			RTP intensity		
1	2	3	Serotonin	Tryptamine	Gramine
SDS	KI	Phosphor	114	563	985
KI	SDS	Phosphor	85.5	340	541
SDS	Phosphor	KI	67.1	334	853
KI	Phosphor	SDS	27.1	190	537
Phosphor	SDS	KI	16.5	75.6	140
Phosphor	KI	SDS	12.3	59.3	254

Compounds: 500 pmol/spot; Solvent: water-ethanol (50 : 50, v/v) mixture containing 1.0 mol/l sodium hydroxide; Potassium iodide: 2.0 μ mol/spot; Sodium dodecyl sulfate: 0.2 μ mol/spot (serotonin, gramine), 0.1 μ mol/spot (tryptamine); $N=3$

Gra では 0.2, Try では 0.1 μ mol/spot 添加のときに最大りん光強度を示し、これらを最適添加量とした。又、過量の SDS の添加はりん光強度の減弱を招くことが分かった。過量の SDS は乾燥操作により基質表面層に不透明な結晶となり析出し、これが励起光の透過を妨げ、りん光強度が減弱したと考えられる。

固体基質室温りん光法では試料溶液の液性が得られるりん光強度に影響を及ぼすことが知られている。そこで、水-エタノール溶液に所定の濃度になるように NaOH もしくは HCl を添加した溶媒を用いて、5-HT, Try, Gra の液性によるりん光強度の変化について検討を行った。結果を Table 1 に示す。NaOH を溶媒に添加すると 3 物質共にりん光強度が増強され、1.0 mol/l のとき最大となり、その後減弱した。これは水素イオン濃度の低下に伴って、基質と発りん光性物質との間の水

素結合への水素イオンによる妨害が減少したためと考えられる。しかし過剰な NaOH は基質表面で乾燥によって白色結晶化し、励起光の透過性を妨げるためりん光強度を減弱させた。一方、HCl を添加した場合も 5-HT, Try でりん光強度の増強が観測されたが、NaOH 添加より増感効果は低かった。Table 1 の結果より、最適な溶媒中 NaOH 濃度を 1.0 mol/l とした。

発りん光性物質 (5-HT, Try, Gra) と増感剤 (KI, SDS) の PVA 基質表面への滴下順序によるりん光強度の違いを Table 2 に示した。発りん光性物質と増感剤の滴下順序は、5-HT と Try については増感剤を連続して発りん光性物質よりも先に滴下したほうが後に滴下するよりも、又増感剤は SDS を KI よりも先に滴下したほうが高いりん光強度を示した。しかし Gra については SDS, KI, 発りん光性物質の順に滴下したときに最もり

Table 3 Analytical figures of merit for serotonin, tryptamine and gramine

Slit width/nm	Ex Em	Serotonin		Tryptamine		Gramine	
		5	10	5	10	5	10
LDR (pmol/spot)		25~5000	5~500	5~5000	2.5~250	5~2500	2.5~250
Slope (log-log)		0.745	0.496	0.776	0.555	0.718	0.435
Correlation coefficient		0.992	0.991	0.990	0.997	0.996	0.991
RSD, % (50 pmol/spot)		9.40	5.23	11.1	6.50	9.74	5.09
Number of points		18	15	21	15	18	15

LDR: liner dynamic range; RSD: relative standard deviation ($n=3$); Solvent: water-ethanol (50 : 50, v/v) mixture containing 1.0 mol/l sodium hydroxide; Potassium iodide: 2.0 μ mol/spot; Sodium dodecyl sulfate: 0.2 μ mol/spot (serotonin, gramine), 0.1 μ mol/spot (tryptamine)

ん光強度が強いという傾向以外は, 5-HT や Try とやや異なった傾向を示した. 以上のようにりん光強度は発りん光性物質と各増感剤の滴下順序に大きく影響され, 3物質共に SDS, KI, 発りん光性物質の順に滴下したとき, 最も高いりん光強度が得られることが確認された.

3・3 5-HT, Try, Gra の検量線

以上の結果より得られた最適条件の基で 5-HT, Try, Gra, 各々の検量線を励起側, りん光側スリット幅 5 及び 10 nm の場合について作成した. 結果を Table 3 に示す. スリット幅を各々 10 nm に広げることによって低濃度側の定量限界は向上した. しかし高濃度側の直線域が狭まり, 高濃度側の定量限界は低下した. しかし, スリット幅を広げると高いりん光強度が得られるため再現性も高く, 低濃度領域での測定が非常に容易になり, 効果的であることが分かった.

本法による定量限界は濾紙を基質とした場合¹⁰⁾と比較して 5-HT と Try に関しては同等, Gra では 1 けた向上しており, 濾紙基質と比較して簡便かつ従来の固体基質を用いれば不可欠であった乾燥不活性ガスを導入することなく 5-HT, Try, Gra の分析が行える本法の有用性が示唆された.

本研究は文部省科学研究費補助金萌芽の研究 (No. 08877322) により行われた.

文 献

- 1) J. Ishida, M. Takada, M. Yamaguchi: *J. Chromatogr.*, **692**, 31 (1997).
- 2) E. Pussard, N. Guigueno, O. Adam, J.-F. Giudicelli: *Clin. Chem.*, **42**, 1086 (1996).
- 3) M. C. Ortega, A. Reyes, M. Morell, J. J. Laserna: *Anal. Lett.*, **19**, 1097 (1986).
- 4) P. Frattini, M. L. Gucci, G. Santagostino, G. L. Corona: *Clin. Chim. Acta*, **92**, 353 (1979).
- 5) J. M. Kellum, B. M. Jaffe: *Gastroenterology*, **70**, 516 (1976).
- 6) R. A. O'Brien, M. Boublik, S. Spector: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **194**, 145 (1975).
- 7) B. Peskar, S. Spector: *Science* (Washington, D. C.), **179**, 1340 (1973).
- 8) M. N. Hussain, M. J. Sole: *Anal. Biochem.*, **111**, 105 (1981).
- 9) J. M. Saavendra, M. Brownstein, J. Axelrod: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **186**, 508 (1973).
- 10) J. R. F. Júnior, A. D. Campiglia: *Talanta*, **42**, 1505 (1995).
- 11) T. Kitade, K. Kitamura, N. Kishimoto: *Anal. Sci.*, **12**, 439 (1996).
- 12) 北出達也, 北村桂介, 和田 稔, 山本恵理: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 201 (1997).
- 13) T. Kitade, K. Kitamura, J. Hayakawa, E. Nakamoto, N. Kishimoto: *Anal. Chem.*, **67**, 3806 (1995).