HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	2,5-ジメトキシテトラヒドロフランを用いたトリプトファンの高感度蛍光定量法
Author(s)	三浦，敏明；大木，康子；鎌滝，哲也
Citation	北海道大学医療技術短期大学部紀要，9，63-69
Issue Date	1997-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/37611
Type	departmental bulletin paper
File Information	9_63-70.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

原　　著

2,5-ジメトキシテトラヒドロフランを用いたトリプトファンの高感度蛍光定量法

三浦　敏明・大木　康子*・鎌滝　哲也*

Sensitive Fluorometric Method for the Determination of Tryptophan with 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran

Toshiaki Miura, Yasuko Ohki* and Tetsuya Kamataki*

Abstract

3-Methylindole is known to form a fluorescent benzpyrrocoline by acid-catalyzed condensation with 1,4-diketone such as acetonylacetone [Robinson and Saxton, 1950, 1952]. On the basis of this reaction, we developed a simple and sensitive fluorometric method for the determination of tryptophan. Upon the reaction with 2,5-dimethoxytetrahydrofuran, acetal form of succinaldehyde, in 40% (v/v) sulfuric acid at room temperature for 20min, tryptophan gave a stable and highly fluorescent product showing an excitation maximum at 292 nm and an emission maximum at 382 nm. This fluorescence reaction was shown to be specific for 3-monosubstituted indoles. A linear calibration curve was obtained over the range of 0.8-80 nmol tryptophan/ml with a detection limit (S/N=2) of 0.4 nmol/ml (20 pmol/reaction tube). The present method was applicable to the sensitive determination of tryptophan in amino acid mixtures. The method was also employed to the assay of tryptophan in human sera.

Key Words: Tryptophan, 3-Monosubstituted indoles, Sufuric acid, 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran, Fluorescence reaction

要　　旨

3-メチルインドールが1,4-ジケトン類と酸性溶液中で縮合して蛍光性ベンツピロコリンを生成するというRobinsonとSaxtonの報告を参考に，簡易で高感度なトリプトファンの新蛍光定量法を開発した。1,4-ジケトン類の中で最も反応性の高いスクシニアルデヒドのアセタール体である2,5-ジメトキシテトラヒドロフランを試薬として用いると，トリプトファンは

北海道大学医療技術短期大学部
*北海道大学薬学部
College of Medical Technology, Hokkaido University,
*Faculty of Pharmaceutical Science, Hokkaido University

40% (v/v) 硫酸中で安定で強度の高い発蛍光体(励起波長 292 nm，蛍光波長 382 nm) を生成した。この反応は 3 位一置換インドール類に特異的であり，トリプトファンに対する検量線は 0.8～80 nmol/ml の範囲で良好な直線性を示し，検出限界 (S/N＝2) は 0.4 nmol/ml (20 pmol/反応チューブ) であった。本法は，他のアミノ酸やアンモニアの妨害を受けず，アミノ酸混合物中のトリプトファンの特異的微量定量に応用可能であった。ヒト血清中のトリプトファンの定量にも本法の適用を試みた。

緒　　言

必須アミノ酸の一つであるトリプトファンは現在は発酵法により大量に製造されており，食品添加物や飼料添加物あるいは輸液などの医薬品に広く利用されている。トリプトファンは生体内でセロトニン，メラトニンなどを生成するセロトニン経路，およびキヌレニンやニコチン酸アミドなどを生成するキヌレニン経路によって代謝される。したがって，トリプトファンやその代謝物の変動は，これらの代謝に関連する病態の指標になるとされている[1,2]。また，トリプトファンは主として肝臓で代謝されるため，その血中濃度は肝機能障害の指標の一つになるとの指摘もある[3]。このように，食品化学や臨床化学分野におけるトリプトファン測定の意義は高く，これまでに吸光法，蛍光法，クロマトグラフ法などの多数のトリプトファン定量法が報告されている[4-7]。これらの方法は感度，選択性，簡易性などの面でそれぞれに特徴があり，測定目的に応じて使い分けられている。

今回，筆者らはトリプトファンが 40% (v/v) 硫酸中で 2,5-ジメトキシテトラヒドロフラン (DMTHF) と選択的に反応し蛍光を発することを見出し，この反応を利用したトリプトファンの簡易で高感度な蛍光定量法を開発した。

実 験 方 法

1．測定機器

蛍光測定には日立 650-10 型分光蛍光光度計を，励起および蛍光スペクトルの測定には島津 510 型自記蛍光分光光度計を使用した。また，恒温槽にはヤマト科学 BT-23 型インキュベータを，遠心分離には久保田マイクロ冷却遠心機 1900 型を用いた。

2．試 薬 類

アセトニルアセトン (2,5-ヘキサジオン) は和光純薬工業より，DMTHF は Aldrich Chemical Co. Inc. より購入したものをそれぞれメタノールに溶解して使用した。濃硫酸には和光純薬工業製 (98.2%，w/w，精密分析用) を用い，精製水で希釈して各濃度の硫酸溶液を調製した。トリプトファンおよびその他のインドール化合物やアミノ酸，アミン類は市販のものをそのまま使用した。トリプトファンは 0.01 M塩酸に溶解して濃度が 0.1 Mの溶液を調製し，これを原液として－20°Cにて保存した。用時，この原液を精製水で所定の濃度に希釈して使用した。実験に用いた精製水は Milli-Q Water システム (日本ミリポア) により精製したものである。

3．DMTHFによるトリプトファンの蛍光定量

40% (v/v) 硫酸 1.0 ml にDMTHF-メタノール溶液 (15 mM) 50 μl とトリプトファン含有試料またはトリプトファン標準溶液 50 μl を加え，十分に混和し，室温，暗所で 20 分間放置後，励起波長 292 nm，蛍光波長 382 nm で溶液の蛍光強度を測定した。

4．血清の前処理

ヒトプール血清 50 μl に 1 M 過塩素酸溶液 450 μl を添加し，ボルテックス・ミキサーで撹拌混合後，遠心分離 (2,000 g，15 分間) した。

この遠心上清50 μlを用い，上記の蛍光反応を行った。

結果および考察

1．インドール類と1,4-ジケトンの反応

トリプトファンの蛍光定量に利用可能性のある化学反応として筆者らが注目したのは，1950年代初頭にRobinsonとSaxtonが行った1-メチルインドール（スカトール，1）と1,4-ジケトン類（2，3）の酸触媒による縮合反応である[8,9]。彼らはストリキニーネの全合成を目的として，その中間体であるカルバゾレニン（4）を，塩化水素を飽和したアルコール中，1とアセトニルアセトン（2）の縮合反応で得ようと試みた。しかし，彼らの予想に反して，この反応で得られたのは4ではなく，青緑色の蛍光を発する1,5,8-トリメチルベンツピロコリン（5）であった（図1）。

2の代わりにレブリルアルデヒド（3）を用いた場合も1,8-ジメチルベンツピロコリン（6）が得られた。一方，インドール化合物については，3位に置換基をもたないインドール自体ではこのような反応は進行せず，1と同様に3位モノ置換インドールであるアセチルトリプタミン（7）はベンツピロコリン（8）を与えた。これらの事実から，2や3のような1,4-ジケトン類は3位一置換インドール類の選択的蛍光試薬として利用できるものと考えられた。

2．1,4－ジケトン類によるトリプトファンの発蛍光反応

最初に2を試薬として用い，3位一置換インドールの一つであるトリプトファンの蛍光反応について検討した。定量法への利用を考慮し，酸溶液としては6-10 M塩酸および20-50%（v/v）硫酸を用いた。これらの酸溶液中のトリプトファンと2（終濃度は0.68 mM）の室温における反応を調べたところ，塩酸溶液中ではほとんど発蛍光せず，硫酸溶液中では発蛍光体（励起波長：292 nm，蛍光波長：382 nm）が生成したものの，その強度は低かった。そこで，2に代わる試薬として，1,4-ジケトン類の中で最も反応性の高いスクシニアルデヒド（9）の利用を考え，実際には，そのアセタール体であるDMTHF（10，酸中で速やかに9に変化する）による反応について検討した。

DMTHFを試薬として用いた場合には，6-10 M塩酸中でもトリプトファンは発蛍光体を生成したが，その生成速度は小さく，蛍光強度も依然として低値であった。しかし，40%（v/v）硫酸中では安定な発蛍光体が15分以内で生成し，その蛍光強度は，2を試薬として用いた場合の約50倍に増大した。また，この条件下では1およびセロトニンも強く発蛍光したが，インドール自体はほとんど発蛍光しなかった。したがって，本条件で生成する発蛍光体はRobinsonとSaxton[9]が指摘しているようなベンツピロコリンのプロトン化型と考えられる（図2）。

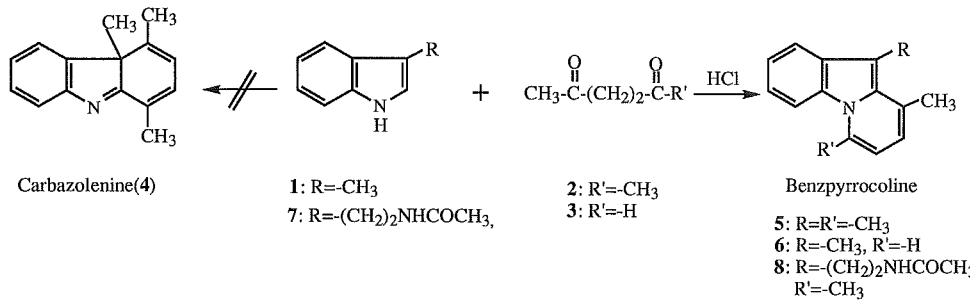
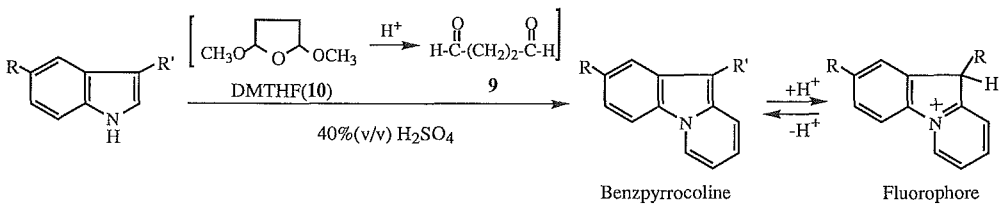


図1　3位一置換インドールと1,4－ジケトン類の縮合反応



Compounds	R=	R'=	Excitation maximum	Emission maximum
Tryptophan	H	$CH_2CH(NH_2)COOH$	292nm	382nm
3-Methylindole	H	CH_3	292nm	382nm
Serotonin	HO	$CH_2CH_2NH_2$	330nm	450nm
Indole	H	H	No fluorescence	

図2　ジメトキシテトラヒドロフラン（DMTHF）によるインドール類の発蛍光反応

3．DMTHFによるトリプトファンの蛍光定量

3・1　至適反応条件

DMTHFによるトリプトファンの発蛍光反応の至適条件を求める目的で，反応溶媒として40%（v/v）硫酸を用い，反応温度（15～35°C）と試薬濃度（終濃度で0.45～0.91 mM）の影響を調べた。その結果，これらの温度および濃度範囲では発蛍光体の生成速度や蛍光強度にほとんど差が認められなかったことから，試薬濃度は0.68 mMとし，反応は室温で行うこととした。

一方，硫酸濃度は発蛍光体の生成速度や強度に大きな影響を及ぼし，35%（v/v）以下では生成速度が低く，45%（v/v）以上では発蛍光体の分解が徐々に進行した。したがって，発蛍光体の生成が15分以内で完結し，しかもそれが安定に存在する溶媒として40%（v/v）硫酸を用いることにし，反応時間は20分とした。

以上の検討結果に基づいて確立した発蛍光反応条件を実験方法の部に記載した。

3・2　特異性

表1はこの発蛍光反応の特異性を示したものである。インドール3-カルボン酸を除くと，3位一置換インドール類は強く発蛍光し，いずれの発蛍光体も292 nmおよび382 nmに極大励起および蛍光波長を示した。5位に水酸基やメトキシ基を有する3,5－二置換インドール類も強く発蛍光したが，それら発蛍光体の極大励起および蛍光波長はそれぞれ330～335 nmおよび430～450 nmであり，トリプトファンの測定波長（292/382 nm）における相対蛍光強度は7%以下であった。一方，3位に置換基をもたないインドール類や，2,3-ジメチルインドールのように，3位に置換基を有していても2位も置換されているインドール類は構造上ベンツピロコリンを生成しえないため，いずれもほとんど発蛍光しなかった。さらに，血液や尿成分の中から選びだした24種のアミノ酸やアンモニアおよびいくつかの代表的な含窒素化合物にも発蛍光は観察されなかった。以上のように，DMTHFによる発蛍光反応は3位一置換インドールに対して特異性の高いことが確認された。

3・3　検量線と精度

本法の検量線は試料中トリプトファン濃度が0.8～80 nmol/mlの範囲で良好な直線性（r＝0.999）を示し，10回の繰り返し測定における相対標準偏差は40，10および2.4 nmol/mlでそれぞれ2.6%，3.0%および3.6%であった。また，本法の検出限界（S/N＝2）は0.4 nmol/ml

表1　DMTHFによる発蛍光反応の特異性

Compounds	Relative fluorescence intensity
3-Monosubstituted indoles	
Tryptophan	100
Tryptamine	96
Indole 3-lactic acid	74
Indole 3-acetic acid	62
3-Methylindole	46
Indole 3-carboxylic acid	0.1
3,5-Disubstituted indoles	
5-Hydroxyindole 3-acetic acid	6.4
Melatonin	6.4
Serotonin	0.5
5-Hydroxytryptophan	0.5
Other indoles	
5-Hydroxyindole, 5-Methoxyindole	<0.01
2-Methylindole, 2,3-Dimethylindole, Indole	
Amino acids	
20 Protein amino acids, Ornithine, Citrulline,	<0.005
γ-Aminobutyric acid, ε-Aminocaproic acid	
Other nitrogen compounds	
Urea, Spermidine	0.03
Uric acid, Spermine, Glutathione, Histamine, Ammonia	<0.005

各化合物を実験方法の部に記載した条件でDMTHFと反応させた後（40%硫酸中，室温，20分間），励起波長292 nm，蛍光波長382 nmでの反応液の蛍光強度を測定。5 μMトリプトファンの蛍光強度を100とし，各化合物の蛍光強度をモル換算での相対値で示している。

(20 pmol/反応チューブ)であり，トリプトファンの微量定量に十分応用可能な感度を有していた。

3・4　アミノ酸混合物中のトリプトファンの微量定量

DMTHFによる蛍光反応ではトリプトファン以外のアミノ酸は発蛍光しないことから，アミノ酸混合物中のトリプトファンの特異的微量定量に本法が応用可能と考えられた。そこで，タンパク質を構成している20種類のアミノ酸のうち，トリプトファン以外の19種類のアミノ酸とアンモニアをそれぞれ80 nmol/mlの濃度で含む試料溶液に各量のトリプトファンを添加し(終濃度で0.8～80 nmol/ml)，本蛍光反応を行ったところ，添加トリプトファン濃度に対する検量線は原点を通る良好な直線性(r＝0.999)を示し，前述した標準トリプトファン溶液に対する検量線と完全に一致した。また，アミノ酸やアンモニアが共存する試料溶液中の本法によるトリプトファン測定値の相対標準偏差（n＝10）は4.0および1.6 nmol/mlでそれぞれ2.7%および3.6%であった。このように，他の

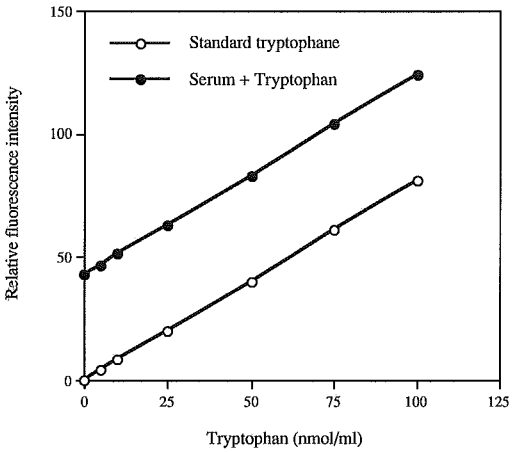


図3 トリプトファン標準溶液およびトリプトファン添加血清に対する検量線
トリプトファン標準溶液(○)およびヒトプール血清にトリプトファン（5～100 nmol/ml 血清）を添加したもの（●）を，実験方法の部に記載した方法により蛍光強度を測定。両直線の傾きの比は 0.96。

アミノ酸やアンモニアが多量に共存しても，本法は，それらの妨害を受けず，アミノ酸混合物中の微量トリプトファンの特異的定量に応用可能であることが示された。

3・5　血清中トリプトファンの定量

血清中のトリプトファン濃度は，血清を過塩素酸で除蛋白後，その遠心上清(血清の 10 倍希釈液に相当）の一部を試料として DMTHF による蛍光法で定量した。図3は，各量のトリプトファンを添加したヒトプール血清（添加濃度：5～100 nmol/ml）に対して得られた本法の検量線を示している。また，比較のために，この添加濃度に対応する各濃度のトリプトファン標準溶液についての検量線も図示した。両検量線とも良好な直線性を示し，両直線の傾きの比からプール血清に対するトリプトファンの平均添加回収率は 96%と求められた。また，本法による繰り返し測定で求められた，このプール血清中のトリプトファン濃度は 55.3±2.0 μM (mean±SD, n=10)であり，その相対標準偏差は 3.6%と良好な結果であった。

さらに，本法によって測定した健常成人男子 10 人の血清トリプトファン濃度は 60.2±15.8 μM(Mean±SD)であり，従来の報告値である 37～71 μM（平均値：54 μM)[10] に近似していた。

DMTHF による蛍光反応ではトリプトファンの代謝物であるトリプタミン，インドール 3-酢酸およびインドール 3-乳酸も強く発蛍光する(表1)。これら3種の3位一置換インドールのうち，トリプタミンは，そのヒト血清中濃度がトリプトファンの1%以下であるので[11]，本定量法の妨害因子とはならない。しかし，ヒト血清中にはトリプトファンの約 10%のインドール 3-酢酸と数%程度のインドール 3-乳酸が存在しており[10]，これらはそれぞれトリプトファンの 62%および 74%の蛍光強度を示す(表1)。したがって，本法によって求められたトリプトファン濃度は，これら両物質による正の誤差のため，実際よりも約 10%高値を示すことになる。この点を解決するは，酸性物質であるインドール 3-酢酸やインドール 3-乳酸と両性物質であるトリプトファンの分離操作を前処理過程に組み入れる必要があり，今後検討の予定である。

文　献

1）Minderaa R. B., Anderson G. M., Volkmar F. R., Akkerhuis G. W. and Cohen D. J.: Urinary 5-hydroxyindole acetic acid and whole blood serotonin and tryptophan in autistic and normal subjects. Biol.Psychiatry, 22: 933-940, 1987.
2）Dunn A. J. and Welch J.: Stress- and endotoxin-induced increases in brain tryptophan and serotonin metabolism depend on sympathetic nervous system activity. J. Neurochem., 57: 1615-1622, 1991.
3）矢島毅彦：生体内トリプトファン及びその関連化合物の分析．ぶんせき，44-46，1993.
4）渡辺光夫：アミノ酸および関連酵素．由岐英剛編〝生化学分析法〟，p.97-99，南江堂，1984.
5）Chuang C-Zee and Ragan F. A., Jr.: Optimiza-

tion of conditions for the simultaneous separation of ten tryptophan metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatograpy. J. Chromatogr., 534: 13-21, 1990.

6) Uhe A. M., Collier G. R., Mclennan E. A., Tucker D. J. and O'dera K.: Quantitation of tryptophan and other plasma amino acids by automated pre-column *o*-phthalaldehyde derivatization high-performance liquid chromatography: improved sample preparation. J. Chromatogr., 564: 81-91, 1991.

7) Lee Chin J. R.: Determination of the catecholamines and serotonin, their precursors tyrosine and tryptophan, and their main metabolites in rat brain using reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric and oxidative amperometric detection in series: J.Chromatogr., 578: 17-30, 1992.

8) Robinson R. and Saxton J. E.: A synthesis of substituted 2: 3-benzpyrrocolines. J. Chem. Soc., 3136-3140, 1950.

9) Robinson R. and Saxton J. E.: Experiments on the synthesis of the ring systems of strychnine and allied alkaloids. J. Chem. Soc., 976-982, 1952.

10) 日本生化学会編：生化学データブック　I，p. 1548，東京化学同人，1979.

11) Morita I., Masujima T., Yoshida H. and Imai H.: Enrichment and high-performance liquid chromatography analysis of tryptophan metabolites in plasma. Anal. Biochem., 118: 142-146, 1981.