

化学発光検出フローインジェクション法による インドール誘導体の定量

今井日出夫[®]， 吉田久信， 升島 努， 応和卓治*

(1983 年 8 月 1 日受理)

化学発光を検出系とするフローインジェクション法で 20 種のインドール誘導体の検出定量を検討した。水溶液中のインドール誘導体をあらかじめペルオキシ二硫酸カリウムで酸化し，1,3-ジブromo-5,5-ジメチルヒダントインと反応させると化学発光を生ずることが観察された。この発光反応はフローインジェクション法で容易に行うことができ，光電子増倍管の前面にらせん状の流路を持った混合セルを置き，光電子計数法により検出される。ペルオキシ二硫酸カリウムの 4% (w/v) 水溶液を 40 °C で反応させた後，0.7% (w/v) 1,3-ジブromo-5,5-ジメチルヒダントインと反応させるとき，感度，定量性が最も良かった。定量範囲はトリプタミンで (0.10~3.10) nmol，日内変動係数は，0.78 nmol において 3.4% (n=10)，トリプトファンで (0.10~3.10) nmol，日内変動係数は，0.78 nmol において 1.8% (n=10) であった。

1 緒 言

インドール化合物の化学発光は，代表的な生物発光物質であるウミホタルルシフェリンがインドール骨格を持つことから多くの人々に興味を持って研究されている。1965 年に初めて Philbrook ら¹⁾が，3-メチルインドールのジメチルスルホキシド溶液に水酸化カリウムの粒を加えたとき，この粒の付近に発光の現れるのを認め，更に多くのインドール化合物を水酸化ナトリウム水溶液に溶解し，ペルオキシ二硫酸カリウムで酸化すると発光が生じると報告して以来，その発光強度，機構などについて多くの報告がなされている。しかしその発光をインドール化合物の高感度分析に適用しようと試みた例はまだない。今回著者らはペルオキシ二硫酸カリウムであらかじめ酸化した多くのインドール化合物が，強アルカリ性で 1,3-ジブromo-5,5-ジメチルヒダントインを加えることによって，Philbrook らの方法に比べて発光がはるかに顕著であることを見だし，フローインジェクション法に基づいた自作の装置を用い，これらインドール化合物の特異性のある微量定量法としての可能性を検討したのでその結果について報告する。

3 試料及び測定

2.1 試 薬

インドール化合物はすべて市販品を使用し，ペルオキシ二硫酸カリウム (PPS) (半井化学製特級) と 1,3-ジブromo-5,5-ジメチルヒダントイン (DDH) (東京化成工業製 1 級) もそのまま使用した。

2.2 装置と測定

発光測定のため採用したフローシステムの概略を Fig. 1 に，インドール化合物の発光の基本操作手順を Fig. 2

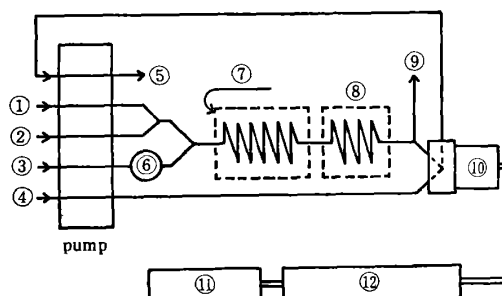


Fig. 1 Schematic diagram of flow system

① Air, ② Potassium peroxodisulfate (PPS), ③ H₂O, ④ 1,3-Dibromo-5,5-dimethylhydantoin (DDH), ⑤ Drain, ⑥ Injector, ⑦ Heating bath, ⑧ Cooling bath, ⑨ Air, ⑩ Photomultiplier, ⑪ Recorder, ⑫ Photon counter

* 広島大学医学部薬品分析化学教室：734 広島県広島市南区霞 1-2-3

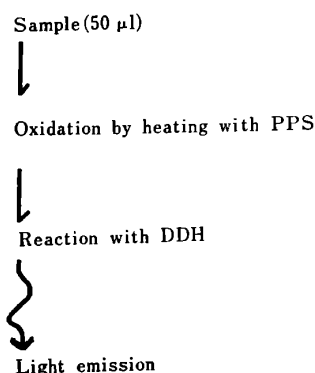


Fig. 2 Standard procedure

に示す。フローシステムは送液部, 混合部, 加熱酸化コイル, 冷却部, 混合発光部に分かれており, すべてのチューブからの送液, 送気, 排出をプロポーショニングポンプ I 型 (テクニコン) 1 台で行った。まずエアセグメントされた PPS 溶液にサンプル液 50 μ l を混入しこれに次いで加熱コイル (内径 1 mm, 全長 6.0 m) を通して 3 分加熱酸化, 次にセルの加熱を避けるために冷却コイル (内径 1.5 mm, 全長 2.0 m) で 20 $^{\circ}$ C, 2 分間の冷却を行い, 空気を抜き取り, 試料溶液のみを混合発光セルに送る。光電子増倍管 (浜松テレビ, R-1463-01 型, 印加電圧 -1100 V) の前面で, DDH の 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液と試料混液が混合して発光する。セルは約 130 μ l の容量を持ち Fig. 3 に示すように発光中の物質が長く滞在するようにうず巻き型²⁾とした。発光は光電子計数装置 (浜松テレビ, C-1230) で測定した。

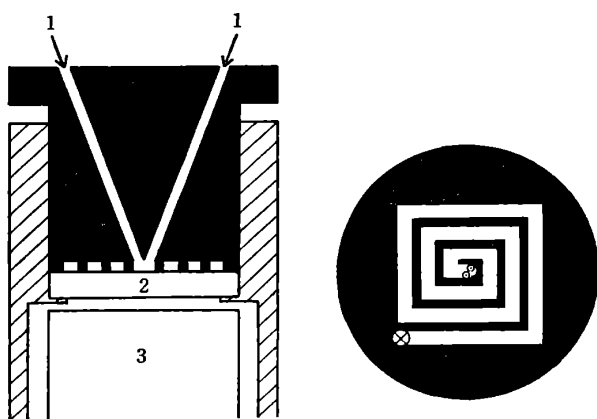


Fig. 3 Cell for luminescence measurement

1: Inlet, 2: Quartz plate, 3: Photomultiplier; ⊙: Inlet, ⊗: Outlet

3 結果と考察

3.1 温度, PPS 濃度, DDH 濃度の発光強度に及ぼす影響

Fig. 4 は 0.1 N 水酸化ナトリウムに溶解したトリ

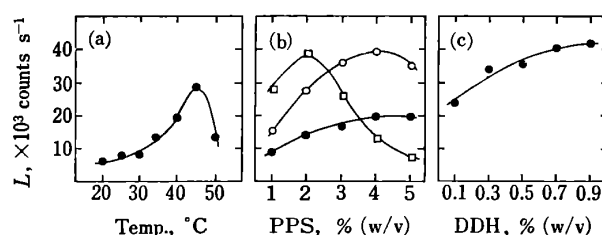


Fig. 4 Effects of temperature and concentration of PPS and DDH on luminescence intensity

[Tryptophan] = 4×10^{-5} M; Injection volume = 50 μ l;
(a) 0.7% (w/v) DDH + 4% (w/v) PPS; (b) 0.7% (w/v) DDH, \circ 45 $^{\circ}$ C, \square 50 $^{\circ}$ C, \bullet 40 $^{\circ}$ C; (c) 4% (w/v) PPS, 45 $^{\circ}$ C

プトファンを試料として発光条件を検討したものである。Fig. 4(a)は, PPS による酸化時間を 3 分に定めて温度の影響を検討したもので, この場合酸化温度を高くすると発光強度は増大するが, 45 $^{\circ}$ C を超えるとかえって発光の低下がみられた。又この反応は温度の影響を非常にうけやすく, 良好な再現性を得るためには, 厳密な温度調節が必要であった。Fig. 4(b)は, PPS 濃度の影響を検討したものである。PPS 濃度が高すぎると発光が低下する傾向がみられ, 試料と PPS 量との間に反応の最適比が存在すると考えられる。しかし, この傾向は, 酸化温度を低下させることによって弱まることが同時に観察された。Fig. 4(c)は, DDH 濃度の影響を検討したもので, 0.5% (w/v) 以上の濃度であれば発光に十分であることが分かる。又 DDH 溶液の pH を 12 以下にすると発光が減弱し, 特に pH 11 以下では発光が起こらなくなることが観察された。これらの結果から, 流速 2 ml/min で, PPS 濃度は 4% (w/v), 加熱酸化温度は 40 $^{\circ}$ C, DDH 濃度は 0.7% (w/v), を分析条件として用いることにした。

3.2 検量線と分析精度

Fig. 5 に, 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液にしたトリプトファンとトリプタミンの検量線を示す。トリプトファンでは定量範囲 (0.10~3.10) nmol, 検出限界 50 pmol, 再現性は 780 pmol において日内変動係数 1.8% ($n=10$), トリプタミンでは定量範囲 (0.10~3.10) nmol, 検出限界 50 pmol, 再現性は, 780 pmol において日内変動係数 3.4% ($n=10$) であった。試料濃度が高くなると発光が飽和値に達した後, 減衰する現象は, Fig. 4(b) に関して前に述べたように, 試料量と PPS 量の最適比が保たれなくなるためか, 濃度消光によって起こると考えられる。

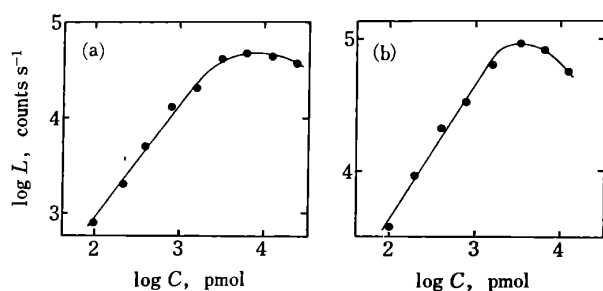


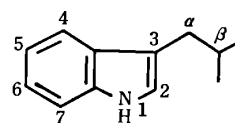
Fig. 5 Calibration plots for tryptophan(a) and tryptamine(b)

3.3 適用対象の分子構造と発光機構の関連

Table 1 は 20 種のインドール化合物及び数種の芳香環、縮合環化合物について各々絶対量で 2 nmol のときの発光強度を、アルカリ性水溶液に溶解したトリプトファン(a 欄)を 1.00 とした相対比で示したものである。なおここでは、加熱酸化温度を 45 °C に設定した。インドール環をもつ通常の化合物 11 種と、インドール環をもつ生体内トリプトファン代謝物 9 種を取り挙げた。多くのインドール化合物が本法で検出可能であることが分かり、インドール骨格の 5 位に水酸基やメトキシ基をもつものが、置換基をもたないものと比べて発光が特に弱いこと、3 位の側鎖の β 位に、ケトン、水酸基、アミノ基が付いたものは発光が比較的強いことが認められる。又 PPS 酸化時の溶液の pH による発光強度の変化がみられたので、0.1 N 水酸化ナトリウム溶液にしたものと、水溶液にした試料を注入したときの発光強度を Table 1 中に比較した。アルカリ性水溶液とした a に比べて中性水溶液とした b では、インドール-3-酪酸、インドール-3-アセトン、インドール-3-酢酸、トリプタミンの発光強度が著しく減少し、一方インドール-3-アセトアルデヒドでは発光が顕著に増大した。又インドールの 2 位と 3 位の間に 2 重結合のないインドリンの発光が観測された。これは次に述べる PPS 酸化の効果と考えられ、興味ある結果である。なお、† に示されるようにチロシン、フェニルアラニン、キノリン、イソキノリン、ナフトールはこの条件では発光は認められず、ナフチルアミンもごく微弱な発光しか示さなかった。次に PPS によって、インドールがどのように酸化されたかを調べるために、PPS 酸化されたインドールを凍結乾燥し、アセトンで固-液抽出を行ったところ、アセトン抽出画分が、残さ画分の約 2 倍の発光強度を示した。又抽出画分をシリカゲル薄層で展開したところ、(5~6) 種の物質が蛍光によって確認され、主に発光した物質は、かなり極性の低い物質であると同時に、水溶液中では不安定でしだいに分解

Table 1 Relative luminescence intensities of tested compounds

	a	b
Indole	0.04	0.11
" -2-carboxylic acid	0.02	0.11
" -3-propionic acid	0.02	0.02
" -3-butylic acid	0.02	0.02
" -3-acetone	7.28	1.37
" -3-carbinol	0.12	0.18
" -3-glyoxylic acid	7.23	11.1
1-Methylindole	0.02	0
2-Methylindole	0.02	0.04
3-Methylindole	0.16	0
Indoline	0.02	0.03
1-Naphthylamine	0.05†	—
1-Naphthol	0†	—
Quinoline	0†	—
Isoquinoline	0†	—
Phenylalanine	0†	—
Tyrosine	0†	—
L-Tryptophan	1.00	0.61
Tryptamine	2.37	0.14
5-Hydroxy-L-tryptophan	0.16	0.04
5-Hydroxyindole-3-acetic acid	0.07	0.04
5-Hydroxytryptamine	0.14	0.02
5-Methoxytryptamine	0.04	0.02
Indole-3-acetic acid	0.58	0.12
" -3-acetaldehyde	1.12	3.95
" -3-lactic acid	1.19	0.28



L-Tryptophan[(a)-1.00] was taken as reference. a: Dissolved in 0.1 N NaOH; b: Dissolved in a minimum quantity of ethanol and diluted with H₂O; † Dissolved in a minimum quantity of ethanol and diluted with 0.1 N NaOH

してゆくことが観察された。しかし残さ画分は、水に溶解後も発光能を維持していた。これらより、インドールを出発物質としたにもかかわらず、PPS 酸化の後には、種々の構造を持ったものが生じ、又水に対する安定性の大きく異なる物質が生じていることから、発光するまでの過程に複雑な経路が存在することが示唆された。McCapra ら³⁾は、テトラヒドロカルバゾールの発光は、インドール骨格の 2 位と 3 位の間にジオキセタンが生成され、そこが開裂するときに生じると提唱し、Saito ら⁴⁾が類似化合物でこの機構の証明を行っている。Kopecky ら⁵⁾は、ジオキセタンは炭素-炭素間の二重結合と一重項酸素の反応では生成されず、これに次いで塩基性溶液中での DDH との反応によりはじめて生成されるとしている。ジオキセタンは Schaap ら⁶⁾及び Zaklika ら⁷⁾によってかなり極性の低い物質であることが示されている。又極性溶媒中では不安定で分解しやすい発光性であることも Saito ら⁴⁾又は Nakamura ら⁸⁾に

よって報告されており, 著者らの実験結果も一部これを裏付けるものがある. これらのことより, 著者らの系では種々の生成中間体が確認されているが, ジオキセタンが, 発光経路における一つの間mediateとなつてゐる可能性が非常に大きいと考えられる. 現在発光種の構造の詳細な検討を行っているが, 生成中間体が多種であることに加えて構造の変化を起こしやすいため, 決定が困難である.

4 結 語

著者らはトリプトファン代謝物を含む 20 種のインドール誘導体について, あらかじめペルオキシ二硫酸カリウムで酸化した後, 1,3-ジブromo-5,5-ジメチルヒダントインの 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液との反応による顕著な化学発光を見だし, これを光電子計数検出系をもつフローインジェクション法でインドール類の微量分析法を検討した. 本法による発光機構はいまだ十分明らかでないが, インドール類一般に観察される発光と考えられる. 本法は水溶液試料に適用でき, 分析精度が高いことに特徴を有するが, 測定感度が蛍光法に比し低いので, 例えば尿中のトリプトファン代謝物には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離と組み合わせて適用できると考えられ, 目下検討中である. 本法は蛍光法と違って暗視野中での発光の計測に基づく方法であるから, 光電子計数の技術向上, 流液系, 発光セルの改良によって, 測定感度の飛躍的向上が期待できると考える.

文 献

- 1) G. E. Philbrook, J. B. Ayers, J. F. Garst, J. R. Totter : *Photochem. Photobiol.*, **4**, 869 (1965).
- 2) 佐伯行一, 野村光洋, 村地 孝: 臨床化学, **10**, 286 (1981).
- 3) F. McCapra, D. G. Richardson, Y. C. Chang : *Photochem. Photobiol.*, **4**, 1111 (1965).
- 4) I. Saito, S. Mtsugo, T. Matsuura : *J. Am.*

Chem. Soc., **101**, 4757 (1979).

- 5) K. R. Kopecky, J. E. Filby, C. Mumford, P. A. Lockwood, J. Y. Ding : *Can. J. Chem.*, **53**, 1103 (1975).
- 6) A. P. Schaap, P. A. Burns, K. A. Zaklika : *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 1270 (1977).
- 7) K. A. Zaklika, P. A. Burns, A. P. Schaap : *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 318 (1978).
- 8) H. Nakamura, T. Goto : *Photochem. Photobiol.*, **30**, 27 (1979).



Determination of indole derivatives by flow injection method with chemiluminescence detection. Hideo IMAI, Hisanobu YOSHIDA, Tsutomu MASUJIMA, and Takuji OWA (Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University School of Medicine, 1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima, 734)

Determination of indole derivatives in aqueous solution was investigated by a flow injection method with chemiluminescence detection. It was found that indole derivatives oxidized beforehand by heating with potassium peroxodisulfate emitted light on mixing with 1,3-dibromo-5,5-dimethylhydantoin solution. The reaction was made to proceed in a flow injection system, and the chemiluminescence intensity was measured by a photon counter PM tube placed in front of the mixing cell with spiral channel. The optimum conditions selected were as follows; the concentration of potassium peroxodisulfate was 4.0 % (w/v), that of 1,3-dibromo-5,5-dimethylhydantoin was 0.7 % (w/v) in 0.1 N NaOH solution, and the optimum temperature of the oxidation reaction was 40 °C at the flow rate of 2.0 ml/min in a reaction coil of 1 mm i.d. and 6 m length. The linear range of the determination was (0.10~3.10) nmol with C.V. value of 1.8 % (within-run at 0.78 nmol) for tryptophan and (0.10~3.10) nmol with C.V. value of 3.4 % (within-run at 0.78 nmol) for tryptamine.

(Received August 1, 1983)

Keyword phrases

chemiluminescence detection of indole derivatives by flow injection method; oxidation of indole derivatives by potassium peroxodisulfate.