

ガスクロマトグラフィー／ 陰イオン化学イオン化質量分析法による ラット脳内フェニル酢酸の定量

岡山大学医学部脳代謝研究施設病態生化学部門（主任：庄盛 敏廉教授）

川 端 昌 弘

（昭和63年3月16日受稿）

Key words：フェニル酢酸，ガスクロマトグラフィー／陰イオン化学イオン化質量分析法，セファデックスG-10，抗うつ薬， β -フェニルエチルアミン

緒 言

内源性微量アミンの一つである β -フェニルエチルアミン（PEA）は、精神分裂病様の臨床症状を引き起こすアンフェタミンに構造や行動薬理学的作用が類似しており¹⁾、さらに脳内分布に部位差が存在すること²⁾、代謝速度が極めて速いこと³⁾やシナプトソーム分画に多く分布すること⁴⁾などから、神経伝達物質あるいは神経調節物質としての役割をもつのではないかと推測されている。しかしながら、微量のPEA濃度を測定しうる高感度な測定法がなかったため、その研究はドパミンやノルエピネフリン等に比べて大きく立ち後れている。一方、PEAの主要代謝物であるフェニル酢酸（PAA）については、精神分裂病やうつ病などの精神疾患における尿中排泄量、血中濃度や髄液中濃度の測定が行われており、その成績からPEAとこれらの疾患の病因との関連性が示唆されてきた⁵⁻⁷⁾。しかし、それらの測定のために従来主として用いられてきたガスクロマトグラフィー／電子衝撃（EI）質量分析法⁸⁾は、脳内PAAの定量には測定感度が十分でなく、またガスクロマトグラフィー法⁹⁻¹¹⁾や高速液体クロマトグラフィー法¹²⁻¹⁴⁾も著しく測定感度が低いため、脳内PAAに関する研究はほとんど行われていない。そこで著者は脳内PAA濃度の測定法について検討した結果、セファデックスG-10による抽出とガスクロマトグラフィー

／陰イオン化学イオン化（NCI）質量分析法を組み合わせることによって、微小脳試料中のPAAを極めて精度よく測定する方法を確立することができた。本論文ではこの測定法の詳細について述べ、併せて本法を用いて得られたラット脳線条体PAA濃度に対する、いくつかの薬物の影響について報告する。

材 料 と 方 法

1. 試 薬

フェニル酢酸（PAA）は和光純薬工業株式会社、フェニル酢酸の安定同位体（ $C_6^2H_5C^2H_2COOH$ ，PAA- d_7 ）はMSD ISOTOPES社、バージリンおよび β -フェニルエチルアミン（PEA）はSigma Chemical社、ペンタフルオロベンジルブロマイド（PFBB）はPierce Chemical社から購入した。また、塩酸イミプラミンは吉富製薬株式会社、塩酸アミトリプチリンは萬有製薬株式会社、塩酸ミアンセリンは日本オルガノン株式会社から提供を受けた。その他の試薬はすべて市販の高速液体クロマトグラフィー用純度または特級のものを用いた。

2. 動物実験

測定法の検討および脳内PAA濃度に及ぼす薬物の影響をみる実験では、いずれもSprague-Dawley系雄ラット（体重160—240g）を用いた。使用した薬物はすべて、生理的食塩水に溶解して腹腔内に投与した。まず脳内PAAの生成経路

を知る目的で、PEA 50mg/kgあるいはバージリン100mg/kgを投与し、前者の場合は動物を投与10分後に、後者の場合は3時間後に屠殺した。抗うつ薬急性投与実験では塩酸イミプラミン20mg/kg、塩酸アミトリプチリン20mg/kg、または、塩酸ミアンセリン10mg/kgを投与し、各群とも2時間後に屠殺した。また、イミプラミンのラット脳内PAAに及ぼす経時的影響をみた実験では、20mg/kg投与30、120および240分後に屠殺した。さらにイミプラミン慢性投与実験では1日1回7日間、午前10—11時に20mg/kgを投与し、最終投与2時間後に屠殺した。以上の各実験とも対照群には生理的食塩水を投与した。ラットは9秒間液体窒素に浸した後すばやく断頭し、頭部を20分間氷水中に静置した後に脳を取り出し、 -10°C 以下の低温箱内で両側線条体を肉眼的に切り出した。脳試料は測定まで -80°C の冷凍庫内に保存した。

3. 測定試料の作成

両側線条体（湿重量約20—40mg）に0.01M過塩素酸溶液1.0mlと内部標準としてPAA- d_7 3 ngを加えてホモジナイズし、20,000 gで20分間遠沈した。得られた上清800 μl に濃硝酸を1滴ずつ加えてpH 1—2とし、セファデックスG—10（Pharmacia Fine Chemicals社）を充填したエコノカム（ $5 \times 70\text{mm}$ 、Bio—Rad社）に流した。このカラムは使用前に0.02Mアンモニア溶液3.0mlで洗浄し、0.01M硝酸溶液3.0mlにて平衡化した。上清が流出した後、0.01M硝酸溶液1.0mlと0.005Mリン酸緩衝液（pH 8.5）1.0mlで順次洗浄し、つぎの0.005Mリン酸緩衝液2.0mlにてPAAを溶出した。溶出液は遠心型エバポレータを用いて真空乾固した。検量線作成のための標準試料は0.01M過塩素酸溶液800 μl にPAAをそれぞれ125, 500, 1,000, 2,000および4,000 pgを加えて作り、これに脳試料と同様に3 ngのPAA- d_7 と濃硝酸1滴ずつを加えた後、セファデックスG—10カラムに流した。また、セファデックスG—10によるPAAの回収率の検討は、2 ngのPAAを含む試料をカラムに流した後に溶出液2.0mlにPAA- d_7 3 ngを加えたものと、カラムを通さないリン酸緩衝液2.0mlにPAA 2 ngおよびPAA- d_7 3 ngを加えたものとを比較す

ることにより行った。さらに測定方法全体のPAA回収率は、ラット線条体を用いて得た上清を二群に分け、一群には水20 μl を、他群にはPAA 2 ngを含む20 μl 水溶液を加えて、両群を比較することにより検討した。

4. 誘導体の作成

遠心乾固して得られた残渣を水20 μl とエタノール150 μl に溶かし、0.3mlリアクティブイアル（Pierce Chemical社）に移した後に1%（w/v）水酸化カリウム—エタノール液5 μl と10% PFBB—エタノール液50 μl を加えた。バイアルに栓をし、 75°C で40分間加熱した後、冷却して窒素ガス下で蒸発乾固させた。測定直前に残渣を水10 μl と n -ヘプタン20 μl に再溶解し、よく混和後遠沈してヘプタン層0.1—0.3 μl をガスクロマトグラフに注入した。

5. ガスクロマトグラフィー／

質量分析法の条件

測定機器として島津製作所製 SCAP 1123データ処理システムを搭載した GC MS 9020DF ガスクロマトグラフ／質量分析装置を用いた。ガスクロマトグラフには5% Silicone SE—52 on Uniport HP（80—100 mesh、ガスクロ工業株式会社）を充填した内径0.3cm、長さ5.0mのガラスカラムを用い、注入口温度は 240°C 、カラム温度は 200°C に設定した。キャリアガスにはヘリウムを用い、流量は20ml/minとした。質量分析装置の条件はEI法ではイオン化電圧20eV、NCI法ではイオン化電圧200eV、イオン化電流300 μA とした。両法ともセパレータ温度は 240°C 、イオン源温度は 260°C とし、NCI法の反応ガスにはイソブタンを用いた。マスフラグメントグラフィーにおいては、EI法では m/e 316をPAAに相当するものとして、NCI法では m/e 135をPAA、 m/e 142をPAA- d_7 に相当するものとして測定に用いた。EI法とNCI法との測定感度の比較には、EI法ではPAA 10ngを誘導体化し、 n -ヘプタン20 μl に溶解してその0.5 μl を注入した。一方、NCI法ではPAA 200pgを誘導体化し、 n -ヘプタン20 μl に溶解してその0.2 μl を注入した。

6. 統計処理

得られたデータの有意差検定には、Student's

t-test または Cochran's t-test を用いた。

結 果

最初に NCI 法と EI 法とを比較した成績を示す。Fig. 1 は、NCI 法における PAA のペンタフルオロベンジルエステル(PAA-PFB)と PAA-d₇ のペンタフルオロベンジルエステル(PAA-d₇-PFB) のマススペクトルである。上段に示した PAA-PFB では全イオン強度 (m/e 50-400) に対して、m/e 135 が 74.1%，下段に示した PAA-d₇-PFB では m/e 142 が 74.0% とほぼ単一なスペクトルを示した。一方、Fig. 2 に示したように EI 法においては、上段の PAA-PFB では全イオン強度 (m/e 50-400) に対する主なスペクトルは、m/e 91 が 51.6%，m/e 181 が 3.8%，m/e 316 が 13.4% であり、この他にも多数のフラグメントが認められた。下段の PAA-d₇-PFB では主なスペクトルは m/e 98 が 43.8%，m/e 181 が 6.3%，m/e 323 が 12.7% で、PAA-PFB と同様に他に多数のフラグメントイオンが認められた。つぎに NCI 法での m/e 135 と EI 法での m/e 316 を用いて両測定法による測定感度の比較を行った。NCI 法では注入量 2 pg に対するイオン強度 (ピーク面積) は 193,400 ± 67,200 (Mean ±

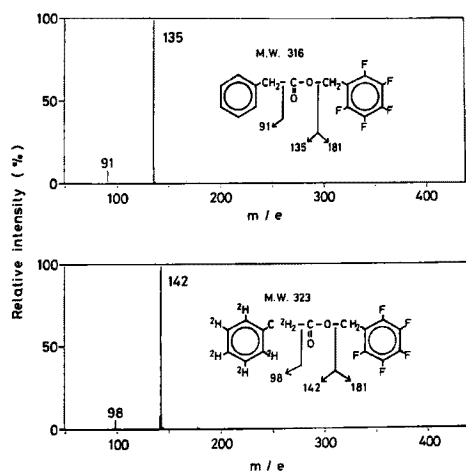


Fig. 1 Mass spectra of pentafluorobenzyl esters of the authentic (upper) and heptadeuterated phenylacetic acid (lower) in the negative ion chemical ionization mode.

SEM, $n = 3$) である一方、EI 法では注入量 250 pg に対するイオン強度 (ピーク面積) は 32,300 ± 11,600 ($n = 3$) であった。すなわち、NCI 法では EI 法に比較して約 750 倍の高い感度を示した。したがって、以下の結果は NCI 法を用いて得られたもののみを示す。

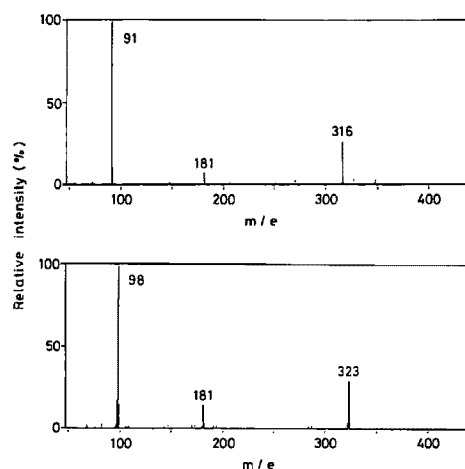


Fig. 2 Mass spectra of pentafluorobenzyl esters of the authentic (upper) and heptadeuterated phenylacetic acid (lower) in the electron impact mode.

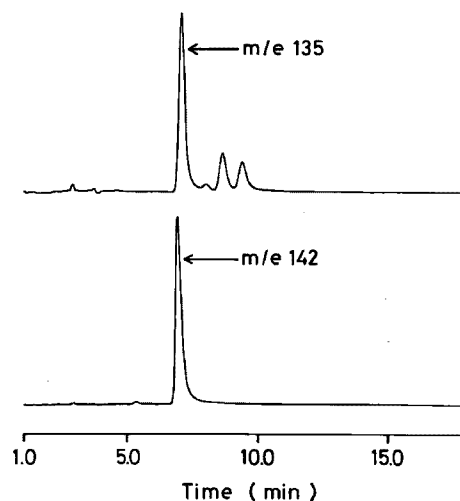


Fig. 3 Typical mass fragmentogram of pentafluorobenzyl esters of phenylacetic acid at m/e 135 and heptadeuterated phenylacetic acid at m/e 142 in the negative ion chemical ionization mode.

ラット線条体を用いて得られた NCI 法によるマスマグメントグラムを Fig. 3 に示した。上段の矢印で示した m/e 135 のピークが PAA-PFB 由来のピークで、下段の矢印で示した m/e 142 のピークが PAA-d₇-PFB 由来のピークである。保持時間は約 7.1 分で、いずれも測定障害となる他のピークは認められなかった。

Fig. 4 は標準試料を用いて得られた検量線である。既知量の内部標準 PAA-d₇ に対する PAA の質量比を横軸にとり、計測された m/e 142 のイオン強度に対する m/e 135 のイオン強度のピーク面積比を縦軸にとってある。相関係数は 0.9999 とすぐれた直線性を示した。

セファデックス G-10 による抽出段階での PAA の回収率は $96.9 \pm 2.0\%$ (Mean $\pm$ SD, n = 5) であった。また、ラット線条体試料に加え

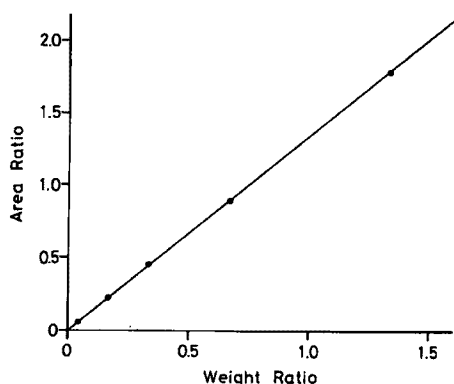


Fig. 4 Calibration curve constructed from the ratios of pentafluorobenzyl esters of phenylacetic acid to heptadeuterated phenylacetic acid with observed ratio as ordinate and known ratio as abscissa.

Table 1 Effects of pargyline and β -phenylethylamine on phenylacetic acid levels in the rat striatum.

	n	PAA (pg/mg protein) ^a
Controls	3	188.5 $\pm$ 23.7
Pargyline (100mg/kg)	4	73.0 $\pm$ 7.0*
β -phenylethylamine (50mg/kg)	4	127330.0 $\pm$ 31581.4**

a : Mean $\pm$ SEM, * : p < 0.01 (Student's t-test) vs. controls,

** : p < 0.05 (Cochran's t-test) vs. controls,

た 2 ng の PAA は 1.97 ± 0.02 ng (n = 5) と定量され、測定法全体としての回収率は $98.4 \pm 1.2\%$ (n = 5) と、極めて良好な結果が得られた。さらに、ラット線条体を用いて測定法の信頼性を検討したところ、'within batch' および 'between batches' の変動係数は、それぞれ 0.81% (n = 5) および 1.24% (n = 5) と極めて安定した結果が得られている。

Table 1 はラット線条体 PAA に及ぼすモノア

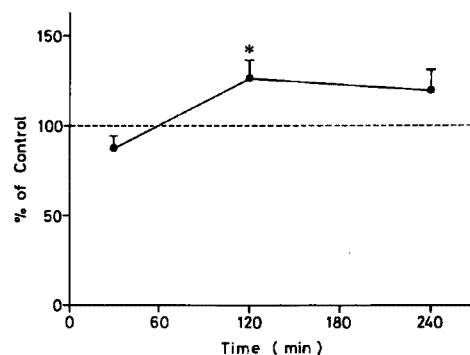


Fig. 5 Time course of phenylacetic acid levels in the rat striatum after the treatment with imipramine (20mg/kg). Data are shown as % of control.

* : p < 0.05 (Student's t-test) vs. controls.

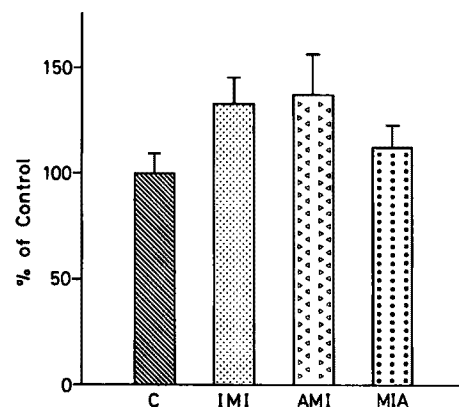


Fig. 6 Effects of acute treatment with imipramine (IMI), amitriptyline (AMI) and mianserin (MIA) on phenylacetic acid levels in the rat striatum. Data are shown as % of control (C).

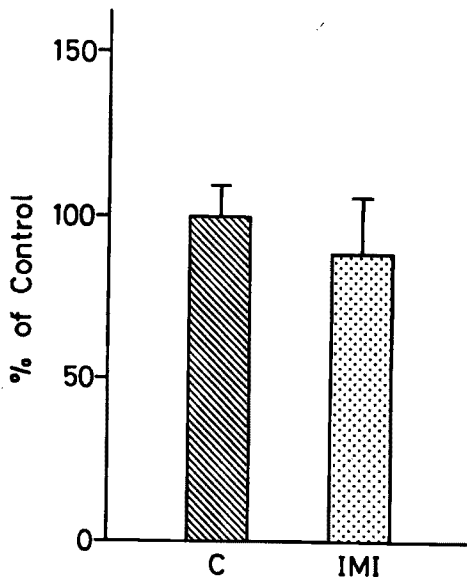


Fig. 7 Effects of chronic treatment with imipramine (IMI) on phenylacetic acid levels in the rat striatum. Data are shown as % of control (C).

ミン酸化酵素阻害剤パージリンおよび前駆物質 PEA の影響をみたものである。パージリン投与群では対照群の約40%と有意な低下がみられる一方、PEA 投与群では対照群の約700倍という極めて高い値が得られた。

Fig. 5 はイミプラミン投与後におけるラット線条体 PAA 濃度の経時変化を示したものである。投与30分後には対照群の $86.8 \pm 6.6\%$ (Mean $\pm$ SEM, $n = 8$) とやや低値を示したが、120分と240分後にはそれぞれ $126.0 \pm 10.3\%$, $119.4 \pm 11.7\%$ ($n = 8$) と高値を示した。120分後の変化は統計的に有意であった。Fig. 6 にはイミプラミン、アミトリプチンまたはミアンセリン投与2時間後におけるラット線条体 PAA 濃度を示した。対照群に対してイミプラミン投与群では $133.0 \pm 12.6\%$ (Mean $\pm$ SEM, $n = 5$)、アミトリプチン投与群では $136.6 \pm 19.8\%$ ($n = 5$)、ミアンセリン投与群では $112.1 \pm 9.6\%$ ($n = 5$) といずれも高値を示したが、有意差は認められなかった。Fig. 7 はイミプラミン慢性投与時におけるラット線条体 PAA 濃度を示

したものであるが、対照群に比して $89.2 \pm 17.5\%$ (Mean $\pm$ SEM, $n = 5$) とやや低値を呈したものの有意差は認められなかった。

考 察

PAA の定量には従来ガスクロマトグラフィー (GC) 法⁹⁻¹¹⁾、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法¹²⁻¹⁴⁾やガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) 法^{8,15-17)}が用いられてきた。このうち、GC および HPLC 法は測定感度が著しく低いため、PAA の尿中排泄量や血中濃度の定量には用いるが、脳内 PAA の定量は困難であった。一方、GC/MS の EI 法の開発によって脳内 PAA の定量は可能となったが、この方法もなお測定感度が十分でないために、ラットでは数個体から得た脳試料を用いての測定が行われているのが現状である⁸⁾。これに対して GC/MS の NCI 法の有用性についてはすでに Faull ら¹⁸⁾によって示唆されていることから、本研究ではまず NCI 法と EI 法との比較を行った。

まず PAA の PFBB による誘導体 PAA-PFB と PAA の安定同体 PAA- d_7 の同誘導体 PAA- d_7 -PFB のマススペクトルを比較したところ、NCI 法では EI 法に比べてフラグメント数が非常に少ないことがわかった。Fig. 1 に示したように m/e 91, 98, 135, 142 および 181 は、それぞれ $C_6H_5CH_2^-$, $C_6^2H_5C^2H_2^-$, $C_6H_5CH_2COO^-$, $C_6^2H_5C^2H_2COO^-$ および $C_6F_5CH_2^-$ に相当するフラグメントイオンであり、 m/e 316 と 323 はそれぞれ $C_6H_5CH_2COOCH_2C_6F_5$ と $C_6^2H_5C^2H_2COOCH_2C_6F_5$ に相当する分子イオンと考えられたので、本研究での NCI 法によるマスフラグメントメトリーにおいては m/e 135 を PAA として、また m/e 142 を PAA- d_7 として測定に用いた。NCI 法によるマスフラグメントグラムでは基線は低く安定しており、目的のピーク周辺には測定の障害となる明らかなピークは認められなかったが、 m/e 135 においては PAA ピークの後に3個のピークが認められた。これらのピークは、PAA をエタノールに溶解して誘導体作成を行った試料においても認められ、PAA-エタノール液、水酸化カリウム-エタノール液およびその両者の混合液をそれぞれ測定しても出現しな

ったが PFBB 液では出現したため、用いた PFBB 液中の混入物と考えられた。さらに、PAA ピークとこれらの3つのピークは2%および3% Silicone OV-1 on Uniport HP (60-80および80-100 mesh), 2% Silicone SE-52 on Uniport HP (80-100 mesh) (ガスクロ工業株式会社) および 3% Thermo 3000 on Shimalite TPA (60-80 mesh) (和光純薬工業株式会社) を用いた場合には一部重なりあい、十分に分離されなかったが、本研究で用いたカラムよりさらに分離能の高い Silicone SE-52 Bonded キャピラリーカラム (50m×0.25mm I.D., $df=1.5\mu m$, ガスクロ工業株式会社) を用いてもこれ以上には分離しなかったため、本研究ではより廉価で取扱いが簡単な 5% Silicone SE-52 on Uniport HP (80-100mesh) を充填した 5.0m×0.3cm I.D. のガラスカラムを用いた。

つぎに両測定法における測定感度の比較を行った結果、NCI 法では EI 法に比べて約750倍という高い感度が得られた。本研究では線条体の湿重量として20-40mgの試料を用いて検討を行ったが、上記のような高感度測定ができることが判明したので、今後の測定には線条体では約10mgの試料があれば十分定量が可能であると考えられる。

以上の成績から NCI 法は測定感度が高く、フラグメント数が少なく、また妨害ピークも存在しないことから、脳内 PAA の測定に適した方法であると結論できる。さらに、この方法を用いて得られた検量線は相関係数0.999以上というすぐれた直線性を示したことや、ラット線条体 PAA を測定した際の 'within batch' と 'between batches' の変動係数はそれぞれ0.81%および1.24%と極めて小さかったことから、測定法全体の信頼性も極めて高いものと考えられる。

従来生体試料から PAA の抽出には、酢酸エチルによる有機溶媒抽出が主に用いられてきたが^{8,15,17}、本研究では回収率の向上と一段階で十分な精製をうするため、セファデックス G-10 による抽出法について検討を加えた。これは解離していない状態の化合物がこの担体の親油性部位に吸着されるという性質を利用したもので、すでに Westerink ら¹⁹や Kobayashi ら²⁰はモノ

アミンやその代謝物の抽出に応用して高い回収率を得ている。方法の項で述べた抽出法は、セファデックス G-10 からの溶出液を分画にわけて検討することにより設定されたものである。その結果セファデックス G-10 による回収率は約97%と高く、すぐれた抽出方法であることがわかった。

ヒト尿中 PAA は90%以上がグルタミン抱合体として存在しており遊離型は少ないが²¹、脳内 PAA は生理的条件下では90%以上が遊離型として存在しているとされる²²。そこで本研究では遊離型 PAA を測定した。脳内 PAA 濃度に関する報告は極めて少なく、ラット尾状核での $64.6 \pm 6.5 \text{ ng/g 湿重量}$ という Durden らの報告⁸やウサギ全脳 $24 \pm 1.6 \text{ ng/g 湿重量}$ という Mosnaim らの報告²³ などがあるのみである。本研究では対照群ラット線条体で $188.5 \pm 23.7 \text{ pg/mg protein}$ という値が得られた。測定部位が異なるため直接の比較はできないが、今後部位差も含めてさらに検討が必要であろう。

L-フェニルアラニンが PAA に代謝される経路には主に二つのものが知られている。その一つは L-フェニルアラニンが芳香族アミノ酸脱炭酸酵素により PEA となり、これがさらに B 型モノアミン酸化酵素 (MAO) によって PAA に代謝される経路である。もう一つは L-フェニルアラニンがアミノ基転移または酸化的脱アミノ化によってフェニルピビン酸となり、ついで脱炭酸されて PAA となる経路である²³。脳内 PAA の生成にこれら二つの経路のいずれが重要なのかは良くわかっていない。Karoum ら⁶はヒト尿中 PAA は PEA を経由する代謝経路によらないことを示唆したが、Gusovsky ら¹³は血中 PAA は主に PEA に由来していると考えている。本研究では B 型 MAO に対する阻害作用の強い²⁷ パージリンの投与によって、線条体 PAA 濃度が対照群の約40%にまで減少することが観察された。これに加えて、PEA 投与10分後に脳内 PAA が著しく高値を示したことは、PEA が血液-脳関門を容易に通過し^{1,24,25}、B 型 MAO によって急速に代謝されて PAA となること^{3,26}を反映していると考えられた。これらのことは脳内 PAA の多くの部分が PEA から生成されることを示唆

するものと考えられるが、PAAの産生経路についてはなお詳細な検討が必要である。

前述したようにいくつかの精神神経疾患におけるPEAの病因的意義が最近再び注目されている。このうち、うつ病患者におけるPAAに関する臨床研究では、尿中PAA排泄量および血中PAA濃度が低下しているという報告^{28,29)}、抗うつ薬によって臨床効果を認めた患者群では低下していた尿中PAA排泄量が対照群の値にまで増加したという報告⁷⁾や、うつ病患者髄液中PAAが低値を示したとする報告³⁰⁾などがある。著者らもすでに、うつ病患者髄液中のPAA濃度が有意に低いことを報告した³¹⁾。しかし、これらの患者はほとんどが抗うつ薬内服中のものであったことから、薬物による影響を除外し得なかったため、本研究ではいくつかの抗うつ薬の線条体PAA濃度に及ぼす影響を調べた。その結果、必ずしも統計的に有意ではないが、抗うつ薬急性投与ではPAA濃度がやや上昇し、イミプラミンの慢性投与では逆にやや低下を示した。したがって、これらの成績が、上述の臨床所見とどのような関連性を有するのか今回の結果からは明確に結論することはできなかった。さらに詳細な検討を加える予定である。

結 語

セファデックスG-10による抽出とガスクロマトグラフィー/陰イオン化学イオン化(NCI)質量分析法との組合せにより、 β -フェニルエチルアミン(PEA)の主要代謝物であるフェニル酢酸(PAA)のラット脳内含量を微小試料を用いて精度よく測定できる方法を開発した。セファデックスG-10によるPAAの回収率は約97%であった。これによって抽出されたPAAと内部標準として用いた安定同位体をペンタフルオ

ロベルジルプロマイドで誘導体化し、NCI法により定量を行った。本法で得られたマスフラグメントグラムには測定の障害となるピークは認められず、標準試料による検量線は絶対注入量1.25—40pgの範囲で相関係数0.999以上と極めて良好な直線性を示した。またラット線条体を用いた際の変動係数でも'within batch'で0.81%、'between batches'で1.24%と安定した値が得られた。本研究で新しく導入したNCI法を従来よく用いられてきたEI法と比較したところ、本法ではマスマスケットルにおけるフラグメント数が著しく少なく、さらにEI法の約750倍という高い測定感度が得られた。本法を用いてラット線条体PAAに及ぼす抗うつ薬の影響をみたところ、急性投与ではPAA濃度がやや上昇し、慢性投与では逆にやや低下したが、有意差はなかった。一方、MAO阻害剤であるパーリリンの投与では対照群の40%と有意な低下を示し、前駆物質であるPEAの投与では対照群の約700倍と著明な高値を示した。

本法は従来の有機溶媒抽出とガスクロマトグラフィー/EI質量分析法による測定方法に比べて選択性および測定感度ともすぐれており、今後の脳内PAAの研究に大いに役立つものと考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました庄盛敏彦教授に謝意を捧げますとともに、直接御指導いただきました小林清史助教授に深謝致します。また、本研究の遂行にあたり御援助いただきました若狭文子嬢、岡本浩志氏および教室の皆様にご心から御礼申し上げます。なお、本研究の一部は昭和62年度文部省科学研究費補助金(課題番号62480479)により行われた。

文 献

- 1) Mantegazza P and Riva M : Amphetamine-like activity of β -phenylethylamine after a monoamine oxidase inhibitor *in vivo*. J Pharm Pharmacol (1963) 15, 472—478.
- 2) Durden DA, Philips SR and Boulton AA : Identification and distribution of β -phenylethylamine in the rat. Can J Biochem (1973) 51, 995—1002.
- 3) Durden DA and Philips SR : Kinetic measurements of the turnover rates of phenylethylamine and

- tryptamine *in vivo* in the rat brain. *J Neurochem* (1980) **33**, 1725—1732.
- 4) Boulton AA and Baker GB : The subcellular distribution of β -phenylethylamine, *p*-tyramine and tryptamine in rat brain. *J Neurochem* (1975) **25**, 477—481.
 - 5) Sandler M, Ruthven CRJ, Goodwin BL, King GS, Pettit BR, Reynolds GP, Tyrer SP, Weller MP and Hirsh SR : Raised cerebrospinal fluid phenylacetic acid concentration : preliminary support for the pheylethylamine hypothesis of schizophrenia? *Commun Psychopharmacol* (1978) **2**, 199—202.
 - 6) Karoum F, Potkin S, Chuang LW, Murphy DL, Liebowitz MR and Wyatt RJ : Phenylacetic acid excretion in schizophrenia and depression : the origins of PAA in man. *Biol Psychiatry* (1984) **19**, 165—178.
 - 7) Sabelli HC, Fawcett J, Gusovsky F, Javaid JI, Wynn P, Edwards J, Jeffriess H and Kravitz H : Clinical studies on the phenylethylamine hypothesis of affective disorder : urine and blood phenylacetic acid and phenylalanine dietary supplements. *J Clin Psychiatry* (1986) **47**, 66—70.
 - 8) Durden DA and Boulton AA : Identification and distribution of phenylacetic acid in the brain of the rat. *J Neurochem* (1982) **38**, 1532—1536.
 - 9) Goodwin BL, Ruthven CRJ and Sandler M : Gas chromatographic assay of phenylacetic acid in biological fluids. *Clin Chim Acta* (1975) **62**, 443—446.
 - 10) Markham G, Lichty DG and Wightman F : Comparative study of derivatisation procedures for the quantitative determination of the auxin, phenylacetic acid, by gas chromatography. *J Chromatogr* (1980) **192**, 429—433.
 - 11) Gusovsky F, Sabelli H, Fawcett J, Edwards J and Javaid JI : Gas-liquid chromatographic determination of total phenylacetic acid in urine. *Anal Biochem* (1984) **136**, 202—207.
 - 12) Yamaguchi M, Matsunaga R, Fukuda K and Nakamura M : Determination of free and total phenylacetic and *p*- and *m*-hydroxyphenylacetic acids in human urine by liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr* (1987) **414**, 275—284.
 - 13) Gusovsky F, Fawcett J, Javaid JI, Jeffriess H and Sabelli H : A high-pressure liquid chromatographic method for plasma phenylacetic acid, a putative marker for depressive disorders. *Anal Biochem* (1985) **145**, 101—105.
 - 14) Pennings EJM, Verhagen JCM and Van Kempen GMJ : Assay of urinary phenylacetic acid by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1985) **341**, 172—175.
 - 15) Fellows LE, King GS, Pettit BR, Goodwin BL, Ruthven CRJ and Sandler M : Phenylacetic acid in human cerebrospinal fluid and plasma : selected ion monitoring assay. *Biomed Mass Spectrom* (1978) **5**, 508—511.
 - 16) Martin ME, Karoum F and Wyatt RJ : Phenylacetic acid excretion in man. *Anal Biochem* (1979) **99**, 283—287.
 - 17) Karoum F, Chuang LW, Mosnaim AD, Staub RA and Wyatt RJ : Plasma and cerebrospinal fluid concentration of phenylacetic acid in humans and monkeys. *J Chromatogr Sci* (1983) **21**, 546—550.
 - 18) Faull KF and Barchas JD : Negative-ion mass spectrometry fused-silica capillary gas chromatography of neurotransmitters and related compounds. *Meth Biochem Anal* (1983) **29**, 325—383.
 - 19) Westerink BHC and Mulder TBA : Determination of picomole amounts of dopamine, noradrenaline, 3, 4-dihydroxyphenylalanine, 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, and 5-hydroxyindolacetic acid in nervous tissue after one-step purification on Sephadex G-10, using high-performance liquid chromatography with a novel type of electrochemical detection. *J Neurochem* (1981) **36**, 1449—1462.

- 20) Kobayashi K, Koide Y and Shohmori T : Determination of *p*-hydroxyphenylacetic acid in cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Clin Chim Acta (1982) **123**, 161—168.
- 21) James MO, Smith RL, Williams RT and Reidenberg M : The conjugation of phenylacetic acid in man, sub-human primates and some non-primate species. Proc Roy Soc Lond B (1972) **182**, 25—35.
- 22) Fulton TR, Triano T, Rabe A and Loo YH : Phenylacetate and the enduring behavioral deficit in experimental phenylketonuria. Life Sci (1980) **27**, 1271—1281.
- 23) Mosnaim AD, Wolf ME and Madubuike UP : Presence and biosynthesis of phenylacetic acid in the rabbit brain. Biochem Pharmacol (1984) **33**, 1993—1996.
- 24) Nakajima T, Kakimoto Y and Sano I : Formation of β -phenylethylamine in mammalian tissues and its effect on motor activity in the mouse. J Pharmacol Exp Ther (1964) **143**, 319—325.
- 25) Garcha G, Imrie PR, Marley E and Thomas DV : [^{14}C] - β -phenylethylamine, its distribution after administration by various routes to cats, and the effects of monoamine oxidase inhibitors. Br J Pharmacol (1985) **86**, 877—888.
- 26) Yang HYT and Neff NH : β -phenylethylamine : a specific substrate for type B monoamine oxidase of brain. J Pharmacol Exp Ther (1973) **187**, 365—371.
- 27) Fuentes JA and Neff NH : selective monoamine oxidase inhibitor drugs as aids in evaluating the role of type A and B enzymes. Neuropharmacol (1975) **14**, 819—825.
- 28) Sabelli HC, Fawcett J, Gusovsky F, Javaid J, Edwards J and Jeffriess H : Urinary phenyl acetate : a diagnostic test for depression ? Science (1983) **220**, 1187—1188.
- 29) Sabelli H, Fawcett J, Gusovsky F, Edwards J, Jeffriess H and Javaid J : Phenylacetic acid as an indicator in bipolar affective disorders. J Clin Psychopharmacol (1983) **3**, 268—270.
- 30) Sandler M, Ruthven CRJ, Goodwin BL and Coppen A : Decreased cerebrospinal fluid concentration of free phenylacetic acid in depressive illness. Clin Chim Acta (1979) **93**, 169—171.
- 31) Kawabata M, Kobayashi K and Shohmori T : Determination of phenylacetic acid in cerebrospinal fluid by gas chromatography-mass spectrometry. Acta Med Okayama (1986) **40**, 271—276.

**Determination of phenylacetic acid in the rat brain by
gas chromatography/negative ion chemical
ionization mass spectrometry**

Masahiro KAWABATA

**Department of Clinical Neurochemistry, Institute for
Neurobiology, Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan**

(Director : Prof. T. Shohmori)

A method coupling gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry (GC/NCI/MS) with a rapid one-step purification on a Sephadex G-10 column was developed to measure free phenylacetic acid(PAA), the major metabolite of β -phenylethylamine (PEA), in small amounts of the rat brain. Recovery of PAA for the Sephadex G-10 column was 96.2 ± 2.0 %. Pentafluorobenzyl derivatives of PAA (PAA-PFB) and heptadeuterated PAA (PAA-d₇-PFB) were determined by GC/NCI/MS. No interfering peaks were present on the mass fragmentogram. A calibration curve constructed from the observed peak area ratio of PAA-PFB to PAA-d₇-PFB and known weight ratio was linear within the range of 1.25 to 40 pg PAA, with a correlation coefficient of more than 0.999. In the rat striatum, PAA was determined with 'within batch' and 'between batches' coefficients of variation of 0.81 % and 1.24 % , respectively. While PAA was significantly decreased by 40 % of controls following treatment with pargyline, the monoamine oxidase inhibitor, a remarkable increase in the metabolite level was found following treatment with PEA. Acute and chronic treatment with antidepressants had no significant effects on PAA levels in the rat striatum. The present method should be useful in future investigations of the functional role of PEA in the brain.