カルボン酸けい光ラベル化剤としての *N,N'*-Dicyclohexyl-*O*-(7-methoxycoumarin-4-yl)methylisourea の合成および性質

合屋周次郎, 高館 明, 藤野博之, 田中利明
熊本大学薬学部¹⁾

Synthesis and Properties of *N,N'*-Dicyclohexyl-*O*-(7-methoxycoumarin-4-yl)-methylisourea as a Fluorescent Labeling Compound for Carboxylic Acids

SHUJIRO GOYA, AKIRA TAKADATE, HIROYUKI FUJINO, and TOSHIAKI TANAKA
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University¹⁾

(Received March 1, 1980)

N,N'-Dicyclohexyl-*O*-(7-methoxycoumarin-4-yl)methylisourea (III) was prepared as a fluorescent labeling reagent for carboxylic acids. Reduction of 4-formyl-7-methoxycoumarin (I) with sodium borohydride afforded 4-hydroxymethyl-7-methoxycoumarin (II), which was converted to the isourea derivative (III) with *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide in the presence of cuprous chloride. 4-Hydroxymethyl-7-methoxycoumarin esters of some aliphatic and aromatic monocarboxylic acids were obtained in good yields (75–93%) by heating carboxylic acids and III in benzene or dioxane for 40 minutes at 80°. The determination of carboxylic acids can be carried out by thin-layer chromatographic separation followed by fluorescence measurement of the esters.

Keywords—fluorescent labeling; carboxylic acid; esterification; 7-methoxycoumarin; *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide; NMR; absorption spectra; emission maximum; TLC; calibration curve

著者らは前報²⁾でけい光ラベル化剤として数種のクマリン誘導体を合成し、それらの分析試薬としての性質について報告した。今回は同様にけい光ラベル化剤の開発を目的としてクマリン誘導体を検索し、カルボン酸のけい光試薬として有効と思われる *N,N'*-dicyclohexyl-*O*-(7-methoxycoumarin-4-yl)methylisourea (以下 DCCI と略す) を新しく合成し、その反応性ならびにラベル化剤としての性質を検討した。

カルボン酸のけい光ラベル化剤としては 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin (4-BrMmc)³⁾ が Dinges⁴⁾ によって使用されてから、種々のカルボン酸のけい光分析に応用されてきたが、⁵⁾ 4-BrMmc 以外のカルボン酸のけい光試薬は極めて少ない。⁶⁾

著者らの合成した DCCI は種々のカルボン酸とベンゼン中おだやかに加熱することにより容易に反応し、対応する 4-hydroxymethyl-7-methoxycoumarin のエステルを比較的好収率で与え、カルボン酸に対して極めて反応性に富むことがわかった。本反応により得られるエステルは Dinges⁴⁾ の 4-BrMmc 法で得られるエステルと同一化合物であり、強いけい光性である。反応生成物は薄層クロマトグラフィー (TLC) により副生成物とは明瞭に

1) Location: Ohe-honmachi, Kumamoto 862, Japan.

2) 合屋周次郎, 高館 明, 田中利明, 中嶋文子, 薬誌, **100**, 289 (1980).

3) J.A. Secrist, III, J.R. Barrio, N. J. Leonard, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1262 (1971).

4) W. Dinges, *Anal. Chem.*, **49**, 442 (1977).

5) W. Dinges, A. Meyer, K.-E. Müller, M. Müller, R. Pietschman, C. Plachetta, R. Sehr, H. Tuss, *Z. Anal. Chem.*, **288**, 361 (1977); W. Dinges, *UV Spectrom. Group Bull.*, **5**, 38 (1977) [*C. A.*, **89**, 19559 (1978)]; W. Dinges, N. Seiler, *J. Chromatogr.*, **145**, 483 (1978); S. Lam, E. Grushka, *J. Chromatogr.*, **158**, 207 (1978); E. Grushka, S. Lam, J. Chassin, *Anal. Chem.*, **50**, 1398 (1978); S. Okuyama, D. Uemura, Y. Hirata, *Chem. Lett.*, **1979**, 461.

6) J.C. Liano, N.E. Hoffman, J.J. Barboriak, D.A. Roth, *Clin. Chem.*, **23**, 802 (1977).

Chart 1

分離することができた。さらに DCCI とカルボン酸との低濃度における反応を安息香酸について検討した結果、反応の再現性は良好であった。また、4-BrMmc や他のカルボン酸けい光試薬に比して、DCCI を用いる方法は縮合剤を必要とせず緩和な条件で反応がすすみ、とくに芳香族カルボン酸も脂肪族カルボン酸と同様に収率よくエステル化された。

DCCI の合成および性質

原料の 4-formyl-7-methoxycoumarin (I) は文献記載の方法^{7a,b)}によりレゾルシンより 3 行程で合成した。次に Chart 1 に示すように I をメタノール中、室温で水素化ホウ素ナトリウムにより還元し 4-hydroxymethyl-7-methoxycoumarin (II) を 66% の収率で得た。さらに II を *NN'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) とともに乾燥テトラヒドロフラン (THF) 中触媒量の塩化第一銅存在下 6 時間加熱還流することにより収率 63% で目的とする DCCI (III) を合成できた。DCCI はシクロヘキサンから再結晶し無色板状晶として得られ、ほとんどの有機溶媒に可溶である。III の構造は次のようにして確認した。III の赤外吸収 (IR) スペクトルにおいて 1665 cm⁻¹ にイソウレアに基づく吸収⁸⁾が認められた。核磁気共鳴 (NMR) スペクトルにおいて、2.8 および 3.5 ppm 附近に N 原子に結合したシクロヘキサン環の C-H のシグナル (後者は N-H シグナルと重なっているが、重水置換により確認した)、3.86 ppm にクマリン環の 7 位 OCH₃ の singlet, 5.28 ppm に 4 位 CH₂ が 3 位プロトンとアリルカップリングした doublet, 6.33 ppm に 3 位プロトンの triplet および 7.51 ppm に 5 位プロトンの doublet のそれぞれのシグナルが認められ、さらに元素分析値も III の計算値とよく一致した。

III の水溶液中およびエタノール溶液中における室温での経時変化を紫外吸収 (UV) スペクトルにより検討した。水溶液試料では、溶液調整後 30 分間はスペクトルにほとんど変化は認められないが、それ以後では時間の経過とともに吸光度の減少 (約 3%) および吸収極大の短波長側へ 3 nm のシフトが見られた。24 時間後の吸収極大の波長は 320 nm であり、これは 4-hydroxymethyl-7-methoxycoumarin (II) のそれと一致する。このことから III は水溶液中ではゆっくりと加水分解を受けて II へ変化するものと思われる。一方、エタノール溶液中では 24 時間後も UV スペクトルにほとんど変化は認められなかった。同様にして III の光による影響についても検討したが、遮光して保存したエタノール溶液と遮光しない溶液との UV スペクトルには有意の差は認められなかつ

7) a) A. Russel, J. Frye, "Organic Syntheses," Coll. Vol. III, ed. by E.C. Horning, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1955, p. 281; b) H. Pechman, C. Duisberg, *Chem. Ber.*, **16**, 2119 (1883); c) T.R. Seshadri, S. Varadarajan, *J. Sci. Ind. Research*, **11B**, 39 (1952) [*C. A.*, **47**, 3302 (1953)]; d) A. Schiavello, E. Cingolani, *Gazz. Chim. Ital.*, **81**, 717 (1951) [*C. A.*, **46**, 6126 (1952)].

8) L.J. Mathias, *Synthesis*, **1979**, 561.

TABLE I. Preparation of Organic Acid Esters IVa—p

Compound ^{a)}	Yield ^{b)} (%)	mp (°C)	Formula	Analysis(%)			
				Calcd		Found	
				C	H	C	H
IVa	86	165—167	C ₁₃ H ₁₂ O ₅	62.90	4.87	63.27	5.15
IVb	91	146—148	C ₁₄ H ₁₄ O ₅	64.11	5.38	64.01	5.34
IVc	88	125—126	C ₁₅ H ₁₆ O ₅	65.21	5.84	65.31	5.51
IVd	86	75—76	C ₂₃ H ₃₂ O ₅	71.10	8.30	71.39	8.25
IVe	93	76—78	C ₂₅ H ₃₆ O ₅	72.08	8.71	72.07	8.54
IVf	85	83—85	C ₂₇ H ₄₀ O ₅	72.94	9.07	72.87	9.12
IVg	91	88—89	C ₂₉ H ₄₄ O ₅	73.69	9.38	73.25	9.64
IVh	85	125—127	C ₁₃ H ₁₂ O ₆	59.09	4.58	59.04	4.70
IVi	92	129—131	C ₁₄ H ₁₂ O ₅	64.61	4.65	64.32	4.53
IVj	92	184—185	C ₁₃ H ₁₁ ClO ₅	55.23	3.92	55.54	3.75
IVk	90	137—139	C ₁₄ H ₁₃ ClO ₅	56.67	4.42	56.97	4.48
IVl	82	154—155	C ₁₈ H ₁₄ O ₅	69.67	4.55	70.11	4.85
IVm	76	162—163	C ₁₉ H ₁₆ O ₆	67.05	4.75	67.63	4.94
IVn	92 ^{c)}	186—187	C ₁₈ H ₁₃ ClO ₅	62.71	3.80	62.89	3.49
IVo	75	147—148	C ₁₉ H ₁₆ O ₅	70.36	4.98	69.73	5.20
IVp	83 ^{c)}	218—220	C ₁₈ H ₁₄ O ₆	66.25	4.32	66.25	4.48

a) The abbreviations for compounds: See Chart 1.

b) Benzene was used as solvent.

c) Dioxane was used as solvent.

TABLE II. Absorption and Fluorescence Spectral Data of Organic Acid Esters

Compound	$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ)	$F_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm ^{a)}	Compound	$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ)	$F_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm ^{a)}
IVa	323 (4.27)	396	IVi	323 (4.17)	396
IVb	323 (4.17)	396	IVj	323 (4.17)	395
IVc	323 (4.18)	395	IVk	323 (4.17)	398
IVd	323 (4.13)	395	IVl	323 (4.14)	397
IVe	324 (4.16)	395	IVm	323 (4.12)	396
IVf	323 (4.13)	395	IVn	323 (4.10)	396
IVg	324 (4.17)	396	IVo	323 (4.12)	395
IVh	323 (4.17)	395	IVp	323 (3.88)	395

a) Excitation wavelength: 320 nm.

た。しかし微量の光分解を考慮して以下の実験は遮光条件下で行なった。

DCCI によるカルボン酸のラベル化反応

イソウレア誘導体を用いる有機酸のエステル化反応の合成化学への応用については多くの報告があり、その有用性についても Mathias の総説⁸⁾ に詳細に述べられているが、分析化学への応用例は比較的少ない。⁹⁾ 今回合成した DCCI はベンゼン溶液中当モルのカルボン酸と 80° で 40 分間加熱することにより 75—93% の収率で対応するエステルを与えた (Table I)。反応溶媒としてはベンゼンの他にジオキサンおよび THF についても検討したが、3 者の間に収率上での有意の差は認められなかった。したがって反応には精製の容易なベンゼンを主として使用し、ベンゼンに難溶な数種の酸についてはジオキサンを使用した。また反応時間は TLC において未反応

- 9) H.-P. Klemm, U. Hintze, G. Gerckem, *J. Chromatogr.*, **75**, 19 (1973); J. Oehlenschleiger, U. Hintze, G. Gercken, *J. Chromatogr.*, **110**, 53 (1975); D.R. Knapp, S. Krueger, *Anal. Lett.*, **8**, 603 (1975); S. Okuyama, D. Uemura, Y. Hirata, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **52**, 124 (1979).

Fig. 1. Thin-Layer Chromatogram of Reaction Mixtures of Fatty Acids Labelled by DCCI(III)

The abbreviations for compounds: See Chart 1.
Solid line spot: DCCI, dotted line spots: by-products, dark spots: esters.

Fig. 2. Relationship between Fluorescence Intensity of 7-Methoxy-4-methylcoumarin benzoate (IVl) and the Amounts of Benzoic Acid

物質のけい光スポットがほとんど消失し、それ以後反応を継続しても TLC クロマトグラムに量的な変化が認められないことを確認して決定した。なお Table I に示した反応収率は TLC でエステルを分離後吸光光度法により求めたものであり、反応生成物の構造はいずれも UV, IR および NMR スペクトルの結果より確認した。Table I に見られるように DCCI は脂肪族のみでなく芳香族カルボン酸に対してもかなり高い反応性を示すことが明らかとなった。一方本反応において得られたエステル類は Chart 1 (II→IV) に示すように常法にしたがい、DCC 存在下 II とカルボン酸との反応によっても得られるが、この反応を試みた数例ではいずれも極めて低収率であり、DCCI を用いる方法に比較して有利な点は見いだされなかった。また 4-BrMmc 法では反応溶媒に不溶な炭酸カリウム等の縮合剤を必要とし、芳香族カルボン酸は脂肪族に比して反応速度が遅いなどの欠点があるが、本法では有機溶媒に易溶な DCCI のみを用い、芳香族カルボン酸も容易にエステル化される。TLC による反応生成物の検索でも 4-BrMmc 法に比して副生成物のスポットが少なかった。DCCI 法により得られたエステル類の UV およびけい光スペクトルの測定結果を Table II に示す。また Fig. 1 に DCCI と飽和脂肪酸との反応溶液の TLC クロマトグラムを示した。Fig. 1 から明らかなように反応生成物（エステル）の近くには副生成物のスポットは少なく、微量の未反応 DCCI や他の副生成物のスポットとも明瞭に分離することができた。

次に、前述の反応条件を用いて低濃度領域における安息香酸の DCCI によるラベル化反応の再現性について検討した。安息香酸と DCCI とをベンゼン中マイクロ還流装置を用いて加熱反応後、反応溶液を窒素気流中で濃縮、TLC 分離後エステル部分をクロロホルムで抽出、溶媒留去しエタノールを加えて試料溶液を調整した。同様の方法で異なる量の安息香酸についてそれぞれ反応を行ない、使用した酸の量とけい光波長 397 nm におけるけい光強度との関係をプロットすると Fig. 2 に見られるような原点を通る直線が得られた。

以上に述べたように DCCI は合成および精製が容易であり長期保存にも耐え得ること、カルボン酸と容易に反応し、しかも低濃度における反応において良好な再現性を示すことなどから、DCCI はカルボン酸のけい光ラベル化剤として極めて有効であることが明らかとなった。なお他の有機酸の DCCI によるラベル化反応についても検討中である。

実験の部¹⁰⁾

4-Hydroxymethyl-7-methoxycoumarin (II) I^{7d)} の 4 g を MeOH 120 ml に懸濁した溶液に NaBH₄ 1.5 g を MeOH 40 ml に溶かし攪拌しながら加える。1 時間後に生じた結晶をろ取し、EtOH から再結晶。無色針状晶 2.5 g を得。mp 183—185°。Anal. Calcd C₁₁H₁₀O₄: C, 64.07; H, 4.89. Found: C, 64.33; H, 4.97. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 320 (4.22). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm⁻¹: 3350, 1700. NMR (DMSO-*d*₆) δ : 3.86 (3 H, s, C₇-OCH₃), 4.75 (2H, dd, CH₂OH), 5.60 (1H, t, C₄-CH₂OH), 6.31 (1H, t, C₃-H), 6.92 (1H, dd, C₆-H), 7.61 (1H, d, C₅-H).

N,N'-Dicyclohexyl-O-(7-methoxycoumarin-4-yl)methylisourea (III) II を 2 g, DCC 2 g および CuCl 約 10 mg を 60 ml の乾燥 THF 中 6 時間加熱還流する。放冷後ろ過し、ろ液を減圧下に蒸発乾固する。残渣をシクロヘキサンから再結晶し無色板状晶 2.5 g を得。mp 126—127°。Anal. Calcd C₂₄H₃₂N₂O₄: C, 69.88; H, 7.82; N, 6.79. Found: C, 69.99; H, 7.68; N, 6.52. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 323 (4.13). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm⁻¹: 3350, 1715, 1665. NMR (CDCl₃) δ : 3.86 (3H, s, C₇-OCH₃), 5.28 (2H, d, C₄-CH₂), 6.33 (1H, t, C₃-H), 7.51 (1H, d, C₅-H).

カルボン酸エステルの合成 DCCI (III) とカルボン酸の各 0.5 mmol を 2 ml のベンゼンまたはジオキサンに溶解し 80°, 40 分間加熱する。析出する難溶性の N,N'-ジシクロヘキシルウレアをろ去し、ろ液を蒸発乾固する。残渣を EtOH から再結晶し標準試料とした (Table I)。

けい光スペクトルの測定 けい光スペクトルの測定には島津 RF 502 型けい光光度計を使用し、いずれも EtOH 溶液とし室温で測定した。

薄層クロマトグラフィー TLC 用シリカゲルはメルク社製 60 G および GF 254 (Type 60) を、展開溶媒にはベンゼン-酢酸エチル系 (1:1, 4:1, 5:1 v/v) を使用した。またスポットは MANASLU-LIGHT (UV: 2536 Å, VIS: 3650 Å) を用いて検出した。

謝辞 本研究に際し、元素分析, IR, NMR および MS スペクトルを測定して頂いた熊本大学薬学部分析センターの諸氏およびマイクロ実験器具を作製して頂いたガラス細工室 平嶋俊郷技官に深謝する。

10) 融点は未補正。UV スペクトルは日本分光 UVIDEK-1 を用い、IR スペクトルは日本分光 IRA-1 を用いて測定。NMR スペクトルは日本電子 C-60H を用い、TMS を内部基準として測定、s=singlet, d=doublet, t=triplet。