薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
110 (6) 457-461 (1990)

アルコール類の蛍光誘導体化試薬 Pyrene-1-carbonyl Azide の合成及びその反応性

藤野博之,* 竹田光宏, 合屋周次郎

熊本大学薬学部

Synthesis and Reactivity of Pyrene-1-carbonyl Azide as a Fluorescent Derivatization Reagent for Alcohols

Hiroyuki FUJINO,* Mitsuhiro TAKEDA and Shujiro GOYA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1
Ohe-honmachi, Kumamoto, 862, Japan

(Received February 2, 1990)

This paper describes the preparation of pyrene-1-carbonyl azide (PCA) which is applicable for the labeling of primary and secondary alcohols for high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection and the optimum conditions for precolumn derivatization reaction.

Alcohols were derivatized quantitatively into the corresponding fluorescent urethanes by treating with PCA at 60°C for 5 min. The derivatives were subjected to HPLC on a TSKgel ODS-120A (250×4.6 mm i.d., 5 µm) column with acetonitrile-ethanol-water (70 : 29 : 1, v/v/v) as the mobile phase and monitored with an excitation wavelength of 342 nm and an emission wavelength of 389 nm. The detection limits for the alcohols were in the range 25–125 fmol per injection with a signal-to-noise ratio of 3.

Keywords—pyrene-1-carbonyl azide; precolumn fluorescent derivatization reagent; alcohol; HPLC

前報¹⁾において第1及び第2アルコール類の蛍光誘導体化試薬として anthracene-1-carbonyl azide (ACA) を報告した。しかしながら、そのラベル化の際、ACA の至適濃度は 12.5 mM と高濃度であり、更にラベル化後に析出する尿素誘導体を除去する必要があるなど誘導体化法に関しては検討の余地が残されていた。今回、反応活性基としては ACA 同様カルボニルアジド基を有するものの、より高感度な試薬の開発を目的に蛍光団に pyrene を配した pyrene-1-carbonyl azide (PCA, III) の合成を試み、ACA のプレラベル化法よりもより簡便な誘導体化条件を確立できたので報告する。

結 果 及 び 考 察

III の合成と性状

Chart 1 に示すように PCA (III) は 1-pyrenecarboxaldehyde (I) を Burtner と Cusic の方法²⁾に準じて pyrene-1-carboxylic acid (II) とした後、氷冷下乾燥ジメチルホルムアミド (DMF) 中、トリエチルアミン (TEA) 存在下、ジフェニルリン酸アジド (DPPA) と反応するとき 69% の収率で得た。III は融点 91°C の黄色針状晶で、その構造は赤外 (IR) 吸収スペクトル、質量分析スペクトル (MS) 及び元素分析の結果より同定した。本品は遮光下結晶状態で冷所 (4°C) に保存するとき少なくとも 6 カ月間その性状に変化は認められなかった。また、III をベンゼン溶液として貯蔵するとき室温下 3 日間、塩化メチレン溶液として貯蔵するとき室温下 6 時間は III の反応性の低下は認められなかった。III 自体は若干の蛍光をもつが、III とアルコール類との反応生成体 (IV) は一般に強い蛍光を与えた。その一例として Fig. 1 に III とコレステロールの反応生成体 (IVi) の励起及び蛍光スペクトルを示す。なお、IVi は ACA のコレステロール誘導体よりも約 8 倍蛍光強度が高かった。

アルコール類の誘導体の合成

Chart 1 に示す第1及び第2アルコール類 10 種を用い、対応する pyrene-1-carbamic acid ester₂ (IV) を合成

Chart 1

した。すなわち、前報¹⁾と同様にトリエチレンジアミン (TEDA) 存在下、III と等モル量のアルコールとをベンゼン中 100°C で 1 時間加熱還流した。いずれも析出した少量の尿素誘導体を除去後薄層クロマトグラフィー (TLC) 及び再結晶法により精製し、標準試料とした。なお、本条件下、TEDA を添加しない場合には IV を得ることができなかった。各誘導体の構造は IR, MS 及び元素分析の結果より確認した (Table I)。同一条件下、第 3 ブタノール及びフェノールに対して III は反応性を示さなかった。また、III はアルコールを加えずに TEDA 存在下ベンゼン中加熱するとき、尿素誘導体を 12%, 1-aminopyrene を 46% の収率で生成した。ACA の場合は 88% の収率で尿素誘導体を生成することから、III は ACA よりも尿素誘導体の生成率が低いことが明らかとなった。

アルコール類のプレラベル化条件の検討

モデル化合物としてコレスタノールを用いプレラム誘導体化条件を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により検討した。内部標準物質 (内標) に IVf を用い、反応の進行状況を生成物と内標とのピーク高さ比より追跡した。反応収率は既知量の標準試料 IVi と生成物とのピーク高さ比より求めた。検出には移動相のアセトニトリル-エタノール-水 (70 : 29 : 1, v/v/v) 溶液中で IVi が最大蛍光強度を示す励起波長 342 nm、蛍光波長 389 nm を用いた。

まず、第 1 法として前報¹⁾と同様に検討を行った。すなわち、コレスタノール 500 pmol, III 2.5 μmol, TEDA 7.5 μmol 及び内標 500 pmol を含むベンゼン溶液 200 μl を反応バイアルに採り、シール後反応温度と反応時間について検討した。その結果、120°C, 20 分間で反応収率は最高値 (70%) に達することが分かった。ACA は 120°C の反応温度では反応性の低下が認められたが、III は 120°C においてもラベル化が可能であった。更に、同一条件下、反応促進剤として TEDA の代りに III の 3 倍モル以上の 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) を

Fig. 1. Fluorescence Excitation and Emission Spectra of III (---, 10⁻⁶ M) and IVi (—, 10⁻⁶ M) in Acetonitrile

a, excitation spectra observed at 392 nm; b, emission spectra obtained by excitation at 343 nm.

TABLE I. Analytical Data for Pyrene-1-carbamic Acid Esters (IVa—j)^{a)}

Compound No.	Yield (%)	mp (°C)	IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (NH) cm^{-1}	Formula	Analysis (%)					
					Calcd			Found		
					C	H	N	C	H	N
IVa	84	184	3275	$\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_2$	78.87	5.23	4.84	79.03	5.29	4.75
IVb	68	104	3268	$\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{NO}_2$	81.08	8.21	3.26	81.03	8.30	3.29
IVc	67	105	3428	$\text{C}_{81}\text{H}_{89}\text{NO}_2$	81.36	8.59	3.06	81.53	8.46	2.93
IVd	45	107	3268	$\text{C}_{88}\text{H}_{48}\text{NO}_2$	81.60	8.92	2.88	81.64	8.94	3.00
IVe	32	110	3268	$\text{C}_{85}\text{H}_{47}\text{NO}_2$	81.82	9.22	2.73	81.64	9.22	3.00
IVf	37	109	3428	$\text{C}_{87}\text{H}_{51}\text{NO}_2$	82.02	9.49	2.59	82.06	9.39	2.63
IVg	48	181	3280	$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_2$	79.18	5.65	4.62	78.96	5.79	4.57
IVh	88	181	3475	$\text{C}_{44}\text{H}_{55}\text{NO}_2$	83.89	8.80	2.22	83.84	8.76	2.43
IVi	87	174	3480	$\text{C}_{44}\text{H}_{57}\text{NO}_2$	83.63	9.09	2.22	83.59	9.10	2.12
IVj	29	208	3460	$\text{C}_{46}\text{H}_{57}\text{NO}_2$	84.23	8.76	2.14	84.16	9.05	2.17

a) All compounds were colorless needles.

Fig. 2. Chromatogram of Alcohols after Labeling with III

A 200 μl of dichloromethane solution containing 100 pmol of each alcohols, 7.5 μmol of DMAP and 2.5 μmol of III was heated at 120°C for 20 min. After cooling, the reaction mixtures was filtered through a 0.45 μm Chromato discs 4N (Gasukuro Kogyo) and a 10 μl aliquot of filtrate was injected into the chromatogram.

Peaks: a, reagent blank; 1, IVf; 2, IVh; 3, IVj; 4, IVi. Column: TSKgel ODS-120A, 4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm; mobile phase: acetonitrile-ethanol-water (70:29:1); flow rate: 1.8 ml/min; detector: fluorescence (Ex. 342 nm, Em. 389 nm).

Fig. 3. Chromatogram of Alcohols after Labeling with III

A 100 μl of dichloromethane solution containing 50 pmol of each alcohols and 5 nmol of III was heated at 60°C for 5 min to evaporate the solvent. After cooling, a 100 μl of dichloromethane was added to this residue and a 10 μl aliquot of this solution was injected into the chromatogram.

Peaks: a, reagent blank; 1, IVc; 2, IVd; 3, IVe; 4, IVf; 5, IVh; 6, IVj; 7, IVi. HPLC conditions are as in Fig. 2.

用いたとき反応収率はほぼ 100% となること、反応溶媒としてトルエン、キシレン及びクロロベンゼン中でも反応の進行が認められたが、ベンゼン中が最も速やかにラベル化されること、III の至適濃度は反応溶液中 12.5 mM であることなどが判明した。この第 1 法では反応時間が 20 分と ACA の場合よりも 30 分短縮された。しかし、III の至適濃度が ACA と同様に高濃度なためラベル化後に析出する尿素誘導体の除去が必要であり、なおかつ III の分解物あるいは副生成物に由来すると思われる妨害ピークのために、コレスタノール以外のアルコール類の検出感度は ACA と比べてあまり向上されなかった (Fig. 2)。次に、III は反応中間体としてイソシアナート基を経由してアルコールと反応すると考えられるので、プレラベル化の第 2 法として先に 7-dimethylaminocoumarin-3-isocyanate (MACI)⁸⁾ で用いた方法を、反応溶媒に塩化メチレン、アセトン、アセトニトリル及びベンゼンを用いて検討してみた。すなわち、各溶媒毎に III 25 nmol、コレスタノール 250 pmol 及び内標 250 pmol を含む 100 μ l の溶液をそれぞれ反応バイアルに採り、シールすることなく一定温度で加熱しながら溶媒を留去したときの反応の進行状況を調べた。なお、溶媒留去後の反応バイアルは放冷後各溶媒 100 μ l を加え、その 10 μ l を HPLC に注入した。その結果、塩化メチレンでは 60°C で 5 分間、アセトンでは 70°C で 10 分間、アセトニトリルでは 110°C で 5 分間及びベンゼンでは 120°C で 5 分間加熱しながら溶媒を留去するとき DMAP 非存在下でも反応収率がほぼ 100% に達することが明らかとなった。同一条件下、塩化メチレンの溶媒量を 50, 100, 150, 200 μ l で検討したところ、50 μ l の溶媒量では反応収率が 90% とやや低下し、100 μ l 以上必要であることが分かった。更に、第 2 法に用いる III の至適濃度は第 1 法に比べ 250 倍低い 50 μ M であった。この III の濃度ではラベル化後に尿素誘導体の析出は認められず、フィルターによる除去操作を行わなくとも分析カラムの目詰りは起こらなかった。また、Fig. 3 に示すように第 2 法は第 1 法よりもより緩和な条件下、短時間でラベル化できるために Fig. 2 に比べて妨害ピークも減少した。各アルコールの検出限界は S/N=3 の時、ヘキサデカノールとエイコサノールは 25 fmol、ミリスチルアルコール、ステグマステロール及びコレスタノールは 100 fmol、ステアシルアルコールは 125 fmol と ACA に比べて約 2—10 倍向上した。但し、妨害ピークとオーバーラップするコレステロールの検出限界は 500 fmol であった。第 2 法によるコレスタノールの検量線は 0.125—25 pmol の範囲で直線関係が認められ、コレスタノール 5 pmol を用いた時の反応の変動係数は 3.5% ($n=3$) と良好な再現性を示した。

以上、今回合成した III はプレラベル化法として第 2 法を用いることによりカルボニルアジドを反応活性基に有する既存の試薬⁴⁾ よりもより緩和な条件下、短時間で第 1 及び第 2 アルコール類と対応する蛍光性ウレタン誘導体を与えることから蛍光ラベル化剤として有用であることが示唆された。また、III は第 1 及び第 2 アミン類とも室温で反応するがその誘導体化条件については更に検討中である。

実 験 の 部

III の合成 II²⁾ 1.23 g 及び TEA 0.5 g を氷冷下乾燥 DMF 10 ml に溶かし、0°C で 15 分間攪拌する。この溶液に DMF 5 ml に溶解した DPPA 1.35 g を滴下後、DMF 5 ml で洗い込み、更に 0°C で 2 時間攪拌する。反応混液に冷却した DMF 20 ml を加えた後、冷却した 5% 炭酸水素ナトリウム溶液 30 ml を加える。析出物を冷水で洗浄後乾燥し、アセトンより再結晶。黄色針状品を得た。mp 91°C. Anal. Calcd C₁₇H₉N₃O: C, 75.28; H, 3.34; N, 15.49. Found: C, 75.41; H, 3.58; N, 15.38. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 2142, 1698. MS m/z : 271 (M⁺).

標準試料 (IVa—j) の合成 III 50 mg, TEDA 20 mg 及びアルコール 0.18 mmol をベンゼン 10 ml に溶かし、100°C, 1 時間加熱還流する。析出物を濾去し、濾液を減圧下濃縮後 TLC (展開溶媒: *n*-ヘキサン-ベンゼン-酢酸エチル (20:10:1, v/v/v)) に付す。生成物のフラクションをベンゼンで抽出後溶媒留去。残渣をエタノールより再結晶した。

HPLC HPLC 装置は検出器に日立 650-10S 型分光蛍光光度計を備えた日立 655 型を用いた。カラムはステンレスカラム (4.6 mm i.d.×250 mm) に TSK gel ODS-120A (粒子径 5 μ m, 東ソー製) をスラリー法により充てんしたものを用いた。移動相はアセトニトリル-エタノール-水 (70:29:1, v/v/v) を用い、流速 1.8 ml/min, 室温で送液した。蛍光検出器は励起波長 342 nm, 蛍光波長 389 nm にセットした。

検量線 コレスタノール (0.05—10 nmol/ml), III (200 nmol/ml) 及びエイコサノール (2 nmol/ml) の塩化メチレン溶液を調製する。濃度の異なるコレスタノール溶液 25 μ l をそれぞれ反応バイアルに採り、各バイアルに III の溶液 25 μ l, エイコサノールの溶液 25 μ l 及び塩化メチレン 25 μ l ずつを加え全量 100 μ l とする。この混液をアルミブロック恒温槽中 60°C で 5 分間加熱しながら溶媒を留去。放冷後塩化メチレン 100 μ l を加え、こ

のうち 10 μ l を HPLC に注入した。得られたエイコサノール誘導体 (IVf) に対するコレスタノール誘導体 (IVi) のピーク高さ比より定量し検量線を作成した。

引用文献

- 1) 藤野博之, 飛高光治, 合屋周治郎, 薬誌, **109**, 606 (1989).
- 2) R. R. Burtner, J. W. Cusic, *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 262 (1943).
- 3) 藤野博之, 江口充宏, 合屋周次郎, 薬誌, **110**, 155 (1990).
- 4) A. Takadate, M. Irikura, T. Suehiro, H. Fujino, S. Goya, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1164 (1985); M. Yamaguchi, T. Iwata, M. Nakamura, Y. Ohkura, *Anal. Chim. Acta*, **193**, 209 (1987).