薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
114 (10) 794-798 (1994)

蛍光誘導体化試薬 Ethyl 1-(Difluoro-1,3,5-triazinyl)-2-methylindolizine-3-carboxylate の合成及びその反応性

藤野博之,* 神谷志朗
北九州津屋崎病院薬局

Synthesis of Ethyl 1-(Difluoro-1,3,5-triazinyl)-2-methylindolizine-3-carboxylate as a Fluorescent Derivatization Reagent and Its Reactivity

Hiroyuki FUJINO* and Shirou KOYA

Department of Pharmacy, Kitakyushu Tuyazaki Hospital,
1693, Munakata-gun Tuyazaki-machi Watari,
Fukuoka, 811-33, Japan

(Received May 23, 1994)

Ethyl 1-(difluoro-1,3,5-triazinyl)-2-methylindolizine-3-carboxylate was found to be a selective fluorescence derivatization reagent for primary and secondary amines. The reagent reacted with amines in aqueous acetonitrile in the presence of sodium hydroxide to give the corresponding fluorescent products, which could be separated on a TSK gel ODS-80TM reversed-phase column with aqueous methanol as eluent.

2-Phenethylamine and spermidine were used to investigate the derivatization conditions. The detection limits (signal-to-noise ratio=3) of each compound were 3 and 2 pmol per 10 μ l injection volume, respectively. Alcohols, thiols and aromatic amines did not give any fluorescent products under these derivatization conditions.

Keywords—ethyl 1-(difluoro-1,3,5-triazinyl)-2-methylindolizine-3-carboxylate; amine; HPLC

化学分析法の開発においてフッ素化合物の特性を活用する試みが行われている。¹⁾ 含フッ素反応活性基を有する高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用蛍光誘導体化試薬としても 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole,²⁾ 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole,³⁾ 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole,⁴⁾ 及び ammonium-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate⁵⁾ がアミン類及びチオール類に、2-(2,3-naphthalimino)ethyl trifluoromethanesulphonate⁶⁾ がカルボン酸類の HPLC 分析に用いられている。

先に、著者は carbonyl fluoride を反応活性基として有するクマリン誘導体がアミン類の蛍光ラベル化剤として有用であることを報告した。^{7,8)}

さらに、エストロゲン及びコルチコステロイド類の蛍光誘導体化剤として開発したイソインドール系化合物⁹⁻¹²⁾ (反応活性基 4,6-difluorotriazinyl 基) もアミン類と反応性を示した。しかし、これらの試薬類は HPLC のクロマトグラム上試薬分解物由来のピークを多数出現するためその検出が困難であった。

今回、イソインドール系化合物よりも妨害ピークの少ないフッ素系蛍光ラベル化剤の開発を

目的にイソインドール類似の蛍光団インドリジン骨格の応用を検討した。その結果、比較的容易に合成できた ethyl 1-(difluoro-1,3,5-triazinyl)-2-methylindolizine-3-carboxylate (EFMIC) を用い、そのアミン類とのラベル化条件について基礎的検討を行ったので報告する。

結 果 と 報 告

EFMIC の合成と性状

Ethyl 2-methylindolizine-3-carboxylate¹³⁾ はその 1 位が親電子置換反応を受けやすく、イソインドール類⁹⁻¹²⁾ 同様、フッ化シアヌルとの縮合反応により容易に difluoro-1,3,5-triazinyl 基が導入された。本品は融点 181—182°C の淡黄色針状晶でその構造はプロトン核磁気共鳴スペクトル、質量分析及び元素分析の結果とよく一致した。EFMIC は非遮光下結晶状態あるいはアセトニトリル溶液として保存する時室温下少なくとも 6 カ月間その性状及び反応性において変化は認められず安定であった。

誘導体の合成

EFMIC は Chart 1 に示す 4 種の脂肪族第一及び第二アミンと等モル量で室温下 1 時間反応

Chart 1

する時対応する蛍光誘導体 (Ia—d) を 34—58% の収率で与えた (Table I)。しかし、同条件下水酸基を有するアセトアミドフェノール、エチニルエストラジオール、2-フェニルエタノール、コルチゾン、芳香族アミノ基を有するベンゾカイン、プロカイン、チオール基を有するベンジルチオール及びアミノ酸 (グリシン、ロイシン) とは反応性を示さなかった。

なお、ラベル化後トリアジン骨格上にフッ素原子が残る理由については不明である。

プレラベル化反応

EFMIC が脂肪族アミン類と選択的に反応することが確認されたため 2-フェニルエチルアミン (PEA) をモデル化合物として用い、プレラベル化条件を HPLC により検討した。検出器の励起波長 (λ_{ex}) 及び蛍光波長 (λ_{em}) は Fig. 1 に示すようにラベル化体 Ia が移動相メタノール-水 (20:1, v/v) 中最大蛍光強度を示す波長にそれぞれセットした。反応収率は既知量の Ia と対応する生成物とのピーク高さ比より求めた。まず、PEA 8 μ M 及び EFMIC 400 μ M を含むアセトニトリル溶液 50 μ l を用いて室温 (20°C) における反応進行状況を追跡した。しかし、EFMIC のみでは 1 時間経過しても 5% の反応収率であった。そこで、1-(difluoro-1,3,5-triazinyl)-2-methylisindole (DFTMI)⁹⁾ 同様、NaOH を用いて反応性の向上を試みた。その結果、80% (v/v)

TABLE I. Analytical Data for EFMIC Derivatives

Compound No.	Yield (%)	mp (°C)	EI-MS (M ⁺)	Formula	Anal. (%) Calcd (Foud)		
					C	H	N
Ia	39	212—213	419	C ₂₃ H ₂₂ FN ₅ O ₂	65.87 (65.62)	5.25 5.28	16.70 16.49)
Ib	58	204—205	397	C ₂₁ H ₂₄ FN ₅ O ₂	63.47 (63.26)	6.04 6.14	17.63 17.36)
Ic	46	183—184	383	C ₂₀ H ₂₂ FN ₅ O ₂	62.66 (62.50)	5.74 5.70	18.27 18.16)
Id	34	134—136	431	C ₂₄ H ₂₂ FN ₅ O ₂	66.82 (66.46)	5.10 5.17	16.24 15.44)

アセトニトリル水溶液 (50 μ l) 中 1 mM NaOH 存在下で反応する時室温下 2 分ではほぼ 100% の反応収率に達することが分かった。なお、ODS カラムの劣化を防ぐため反応液に 17.4 mM 酢酸水溶液 10 μ l を添加して中和後その一部を HPLC に注入した。

この時 EFMIC の至適濃度は 0.4 mM であった。本条件下 PEA の検量線は注入量当たり 4—80 pmol の範囲で直線関係が認められた。40 pmol の PEA を用いたときの反応収率の変動係数は 5.4% ($n=8$) であり、また、その検出限界は、3 pmol ($S/N=3$) であった。

次に、PEA 同様 1 mM NaOH 存在下 EFMIC を用いてスペルミジンのラベル化を試みた。その結果、室温下 1 時間反応する時クロマトグラム上にスペルミジン濃度に比例したピーク高さを示す誘導体のピークの出現することが明らかとなった。さらに、反応温度を 36°C 及び 50°C に高めるといずれの場合も 5 分間で最高ピーク高さに達すること、また、EFMIC 及び NaOH の至適濃度は PEA と同一であることが判明した。本条件下スペルミジンは注入量当たり 3—80 pmol の範囲で直線関係が認められ、検出限界は、2 pmol ($S/N=3$) であった。スペルミジン 40 pmol を用いたときのピークの高さの変動係数は 8.6% ($n=8$) であった。Fig. 2 に 5 種類のアミン標準試料を用いて得たクロマトグラムを示す。各誘導体のピーク高さはラベル化後 4 時間経過しても低下することはなかった。また、先に EFMIC との反応性を調べた水酸基、芳香族アミノ基、チオール基及びアミノ酸は本条件下クロマトグラム上に対応する誘導体のピークを出現しなかった。但し、DFTMI 同様、NaOH 濃度を 10 mM に高める時フェノール性水酸基 (アセトアミドフェノール) とは対応する誘導体のピークを生じた。

以上、今回報告した EFMIC は比較的容易に合成できること、非遮光下に保存しても光分解することなくその反応性は低下しないこと、含水条件下 NaOH 濃度を 1 mM に設定することにより、36°C、5 分間で選択的に脂肪族アミン類をラベル化でき、しかもイソインドール系化

Fig. 1. Fluorescence Excitation and Emission Spectra of EFMIC (----, 1 μ M) and Ia (—, 1 μ M) in Methanol-Water (20:1, v/v)
a, excitation spectra; b, emission spectra.

合物よりも妨害ピークが少ないことが判明し含フッ素蛍光ラベル化剤としてその有用性が示唆された。

実験の部

EFMICの合成 Ethyl 2-methylindolizine-3-carboxylate¹³⁾ 7.1 g をエーテル 20 ml に溶かした後フッ化シアヌル 3.6 ml を添加。室温下 24 時間攪拌後析出物をろ取。ろ取物をアセトンより再結晶して EFMIC の淡黄色針状晶 1.7 g を得た。mp 181—182°C. *Anal.* Calcd $C_{15}H_{12}F_2N_4O_2$: C, 56.60; H, 3.77; F, 11.94; N, 17.61. Found: 56.91; H, 3.60; F, 12.03; N, 17.69. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 1.47 (3H, t, CH_2CH_3), 3.03 (3H, s, 2- CH_3), 4.46 (2H, q, CH_2CH_3), 7.06 (1H, td, 6-H), 7.46 (1H, ddd, 7-H), 8.94 (1H, dd, 8-H), 9.70 (1H, dt, 5-H). MS m/z : 318 (M^+).

Ia—dの合成 EFMIC 20 mg (62 μ mol) と等モル量の各アミンを 60 ml アセトニトリル中室温下 1 時間攪拌後、減圧下溶媒留去。残渣をアセトニトリルより再結晶した。

HPLC HPLC 装置に検出器として日立 F-1000 型分光蛍光光度計を備えた日立 L-6000 型ポンプを用いた。分離カラムは、TSK gel ODS-80TM (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm, 粒子径 5 μ m, 東ソー製) にガードカラム TSK guard gel ODS-80TM (3.2 mm i.d. $\times$ 15 mm) をセットしたものをを用いた。移動相には保持時間 16 分までメタノール-水 (20:1, v/v) を、16 分以後はメタノールを流速 0.8 ml/min で使用した。検出は λ_{ex} 350 nm, λ_{em} 400 nm で行った。

スぺルミジンの検量線 スぺルミジン 15—400 pmol を含む 5 mM NaOH 水溶液 10 μ l に、EFMIC 濃度 1 mM のアセトニトリル溶液 40 μ l をそれぞれ添加後 36°C で 5 分間加温。放冷後各反応液に 17.4 mM 酢酸水溶液 10 μ l を添加しそのうち 10 μ l を HPLC に注入した。

謝辞 本研究に際し御指導頂きました熊本大学薬学部教授 合屋周次郎先生に感謝致します。

Fig. 2. Chromatogram of Amines after Labeling with EFMIC

To a 20 μ l of acetonitrile containing 20 pmol of 2-phenethylamine was added 20 μ l of 1 mM EFMIC in acetonitrile, followed by 10 μ l of 5 mM aqueous NaOH containing 20 pmol of each polyamine. The mixture was kept for 5 min at 36°C. After cooling to room temperature, a 10 μ l of 17.4 mM acetic acid was added. The components were mixed thoroughly, then 10 μ l of the final solution was injected into the HPLC apparatus.

Peaks: 1, reagent blank; 2, EFMIC; 3, 2-phenethylamine; 4, cadaverine; 5, putrescine; 6, piperidine; 7, spermidine; 8, spermine. HPLC: column, TSK gel ODS-80 TM; other conditions, see in the experimental section.

引用文献

- 1) 石川延男監修, “フッ素化合物の合成と機能,” シーエムシー, 東京, 1987.
- 2) Y. Watanabe, K. Imai, *J. Chromatogr.*, **239**, 723 (1982).
- 3) T. Toyo'oka, K. Imai, *Anal. Chem.*, **56**, 2461 (1984).
- 4) T. Toyo'oka, T. Suzuki, Y. Saito, Y. Uzu, K. Imai, *Analyst*, **114**, 413 (1989).
- 5) K. Imai, T. Toyo'oka, Y. Watanabe, *Anal. Biochem.*, **128**, 471 (1983).
- 6) Y. Yasaka, M. Tanaka, T. Shono, T. Tetsumi, J. Katakawa, *J. Chromatogr.*, **508**, 133 (1990).
- 7) H. Fujino, S. Goya, *Anal. Sci.*, **6**, 465 (1990).
- 8) 藤野博之, 合屋周次郎, 薬誌, **110**, 693 (1990).
- 9) 藤野博之, 合屋周次郎, 薬誌, **109**, 195 (1989).
- 10) H. Fujino, S. Goya, *Anal. Sci.*, **5**, 105 (1989).
- 11) H. Fujino, S. Goya, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1939 (1989).
- 12) H. Fujino, S. Goya, *Anal. Sci.*, **8**, 715 (1992).
- 13) I. Dainis, *Aust. J. Chem.*, **25**, 1025 (1972).