



УДК 547.831.269.351.06 : 543.426

© 1990 г.

*А. И. Тоцилкин, И. Н. Грачева***8-МЕТОКСИ-5-ХИНОЛИНСУЛЬФОНИЛХЛОРИД — НОВЫЙ
ФЛУОРОГЕННЫЙ РЕАГЕНТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АМИНОВ И АМИНОКИСЛОТ***Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва*

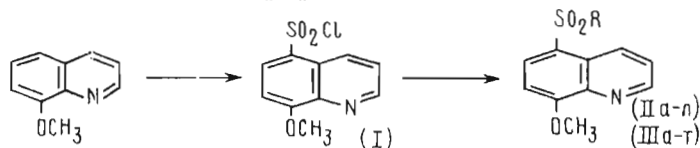
Предложен новый флуорогенный реагент, 8-метокси-5-хинолинсульфонилхлорид, образующий с первичными аминами, аминокислотами и пептидами интенсивно флуоресцирующие производные. Хроматографическое определение аминов, аминокислот и пептидов в виде 8-метокси-5-хинолинсульфонамидов может быть осуществлено в тонком слое силикагеля на уровне 10—100 пмоль.

Различные флуорогенные соединения находят широкое применение для изучения структуры белков и пептидов, а также как аналитические реагенты на аминогруппы [1]. Для этих целей используются 2-(N, N-диметиламино)-5-нафталинсульфонилхлорид (дансилхлорид) [2], его аналоги [3], фталевый альдегид [4], флуорескамин [5], 2-метокси-5,9-дихлоракридин [6], 4-хлор-7-нитробензофуразан [7], лиссамин-родамин Б-сульфохлорид (ларилхлорид) [8] и др. Вместе с тем представляет интерес дальнейший поиск соединений, которые по своим характеристикам могли бы расширить уже имеющийся набор флуорогенных реагентов.

В настоящем сообщении описан синтез и использование 8-метокси-5-хинолинсульфонилхлорида для определения аминов и аминокислот в виде флуоресцентных 8-метокси-5-хинолинсульфонамидов. Флуоресценция этих соединений обусловлена теми же структурными особенностями, что и флуоресцентные свойства алкоксихинолинов (хицин, 6- и 8-алкоксихинолины), и определяется в данном случае наличием ядра 8-метоксихинолина [9]. Флуоресцентные свойства 8-метокси-5-хинолинсульфонокислоты [10] не изучались, а ее амиды до сих пор описаны не были. Названный выше сульфонила хлорид был применен нами без детального описания для синтеза N-(8-метокси-5-хинолинсульфонил)азиридина [11].

8-Метокси-5-хинолинсульфонилхлорид (I) мы получали действием на 8-метоксихинолин хлорсульфоновой кислотой (10-кратным мольным избытком) при 0—15° С [12]. Выделение продукта реакции следует проводить по возможности быстро во избежание его гидролиза, особенно легко идущего в кислом водном растворе. Вместе с тем в кристаллическом состоянии сульфонила хлорид (I) устойчив при хранении в сухой атмосфере по крайней мере в течение года. Положение сульфонила хлоридной группы в нем подтверждено спектром ПМР (отсутствие сигнала 5-H) (см. «Экспериментальную часть»).

Нами показано, что 8-метокси-5-хинолинсульфонилхлорид (I) образует с соединениями, содержащими первичную аминогруппу, 8-метокси-5-хинолинсульфонильные производные (MQS-производные), интенсивно флуоресцирующие при ультрафиолетовом освещении.



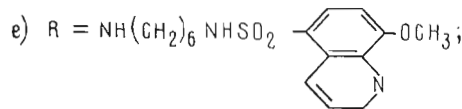
Сокращения: MQS — метоксихинолинсульфонил-, DMF — диметилформамид.

Свойства MQS-производных аминов и аминокислот

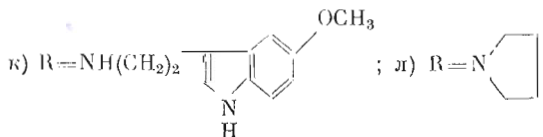
Соединение (шифр)	Выход, %	Т. пл., °С	R _f (система) *
IIa	63	216–218	0,57 (A), 0,54 (B)
IIб	94	108–110	0,3 (A), 0,58 (B)
IIв	82	204–205	0,4 (A), 0,52 (B)
IIг	65	75–76	н. ф.
IIд	72	170–172	»
IIе	18	260	0,2 (A)
IIж	80	252–253	0,37 (A)
IIз	36	134–136	0,58 (A), 0,38 (B)
IIи	82	132–134	0,4 (A), 0,69 (B)
IIк	72	177–178	0,2 (B)
IIл	15	194–196	н. ф.
IIа	60	260	0,37 (A), 0,38 (B)
IIб	72	260	0,37 (A), 0,38 (B)
IIв	52	260	0,36 (A), 0,38 (B)
IIг	62	172–173	0,37 (A), 0,38 (B)
IIд	58	198–200	0,27 (A), 0,4 (B)
IIе	62	191–193	0,27 (A), 0,38 (B)
IIж	56	260	0,24 (A), 0,38 (B)
IIз	48	196–200	0,26 (A), 0,37 (B)
IIи	52	194–196	0,24 (A), 0,38 (B)
IIк	80	169–170	0,29 (A), 0,4 (B)
IIл	39	229–230	н. ф.
IIм	53	210–212	0,23 (A), 0,35 (B)
IIн	50	186–188	н. ф.
IIо	61	184–185	»
IIп	48	185–187	»
IIр	67	260	0,17 (Г)
IIс	65	114–116	0,15 (Г)
IIт	58	183–185	0,16 (Г)

* Условия хроматографии см. «Экспер. часть»; н. ф.—соединение не флуоресцирует.

(II): а) R = NH₂; б) R = NHCH₃; в) R = NHC₂H₅; г) R = N(C₂H₅)₂; л) R = N(CH₃)₂;



ж) R = NHC₆H₅; з) R = NHCH₂C₆H₅; и) R = NH(CH₂)₂C₆H₅;



(III): а) R = -Gly-OH; б) R = -Ala-OH; в) R = -Val-OH; г) R = -Leu-OH; л) R = -Asp-OH
 е) R = -Glu-OH; ж) R = N^ε, N^ε-Lys-OH; з) R = -Arg-OH; и) R = -Ser-OH; к) R =
 -Phe-OH; л) R = -Tyr-OH; м) R = -Cys-OH; н) R = -Pro-OH; о) R = -Trp-OH; п) R =
 ---His-OH; р) R = -Gly-Gly-OH; с) R = -Ala-βAla-OH; т) R = -Ala-Gly-OH.

Были изучены производные алифатических, ароматических и гетероциклических аминов, алкиламинов и аммиака, проведено сульфонилирование ряда α-аминокислот и отдельных пептидов. Производные аминов

Молярные коэффициенты поглощения (ϵ , $M^{-1}\cdot cm^{-1}$) MQS-производных в разных растворителях

Соединение	DMF *	Толуол *	pH 1 **	pH 5 *	pH 7,4 *
IIв	5670±40	5590±80	3130±45	5830±30	5970±100
IIг	2210±20	2270±10	1195±20	2300±20	2340±20
IIи	7000±20	7100±120	3085±20	6330±40	6600±60
IIIа	6270±30	6620±60	3580±30	6620±170	—
IIIб	5720±30	6190±110	3240±30	6600±100	—
IIIр	6830±30	6780±140	3656±30	6270±20	—
IIIт	6030±30	5860±190	3210±30	6250±110	—

* λ_{max} 335 нм.** λ_{max} 315 и 348 нм, ϵ приведены для λ_{max} 348 нм.

Таблица 3

Положения максимумов испускания (нм) и квантовые выходы флуоресценции (%) * MQS-производных

Соединение	DMF		Толуол		pH 1		pH 5		pH 7,4	
	λ_{max}	Q	λ_{max}	Q	λ_{max}	Q	λ_{max}	Q	λ_{max}	Q
IIв	420	38±2	390	1,4±0,3	475	1,2±0,2	395	16,5±1,5	394	8±0,7
IIг	420	37±2	390	1,6±0,3	475	0,2±0,1	438	1,1±0,2	438	0,9±0,1
IIи	420	38±2	390	1,2±0,3	489	2,3±0,2	410	10±1	407	6,5±1
IIIа	400	20±2	390	0,3±0,2	480	5,1±0,3	410	5±0,5	—	—
IIIб	395	38±2	390	0,3±0,2	480	3±0,2	410	5±0,5	—	—
IIIр	395	33±2	390	0,3±0,2	480	7,7±0,3	385	18,5±1,5	—	—
IIIт	395	40±2	390	0,3±0,2	494	6,9±0,3	385	20,5±1,5	—	—

* Квантовый выход определяли по методике работы [13].

(IIа—л) получены в хлороформно-метанольном растворе с применением избытка амина, а производные аминокислот и дипептидов (IIIа—т) — по методике, обычной для получения дансильных производных, в смеси ацетон — 4% водный раствор гидрокарбоната натрия (2 : 1 по объему) при двойном мольном избытке аминокислоты по отношению к хлориду (I).

MQS-производные представляют собой, как правило, довольно высокоплавкие кристаллические соединения (табл. 1). Производные аминов легко растворимы в органических растворителях, MQS-аминокислоты трудно растворимы.

Все MQS-производные имеют практически одинаковые спектры поглощения, спектры возбуждения и испускания флуоресценции. Для некоторых представителей они приведены в табл. 2, 3 и на рис. 1, 2. Производные (IIв, г, и) имеют спектры поглощения с максимумом при 305 нм в органических растворителях (диметилформамид, толуол), а также в водных растворах при pH 5 и 7,4. Производные аминокислот и дипептидов исследованы при pH 5 и 1. При pH 5 они имеют аналогичные спектры поглощения с максимумом при 305 нм. При pH 1 спектры поглощения претерпевают батохромный сдвиг и имеют два максимума — при 315 и 348 нм.

Максимумы спектров возбуждения флуоресценции исследованных соединений соответствуют положениям максимумов в спектрах поглощения (305 нм). Спектры испускания MQS-производных аминов и аминокислот в слабых и нейтральных растворах (pH 5 и 7,4) имеют максимум при 385—438 нм. В 1 н. H_2SO_4 максимум сдвигается до 475—494 нм, в диметилформамиде и толуоле максимум испускания MQS-производных аминов и аминокислот также сдвинут в длинноволновую область и находится при 395—420 нм (рис. 1, 2). Величины квантовых выходов (Q), наибольшие в диметилформамиде (20—40%), существенно снижаются в толуоле и вод-

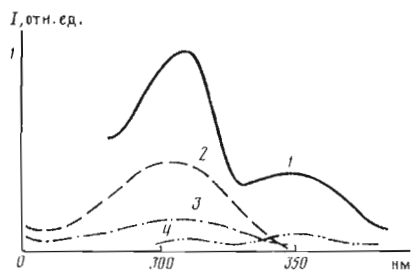


Рис. 1

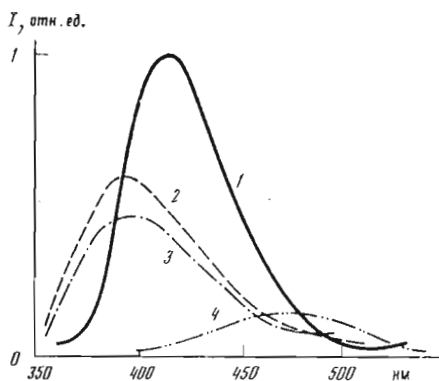


Рис. 2

Рис. 1. Спектры возбуждения QMS-производного (IIv) (15 мкМ) в DMF (1), в водных растворах при pH 5 (2), 7,4 (3), 1 (4). Спектры сняты при $20 \pm 2^\circ \text{C}$

Рис. 2. Спектры испускания QMS-производного (IIv) (50 мкМ) в DMF (1), в водных растворах при pH 5 (2), 7,4 (3), 1 (4). λ_{max} возбуждения см. на рис. 1. Температура $20 \pm 2^\circ \text{C}$

Рис. 3. Фоторазложение QMS (1) и дан-сильного (2) производных этиламина (10^{-8} моль в пятне) на силикагеле. Облучение проводили на приборе Hitachi 650 (ксеноновая лампа 650—1500) с щелью 20 нм при длине волны 315—320 нм. Измерения проводили при 420 нм

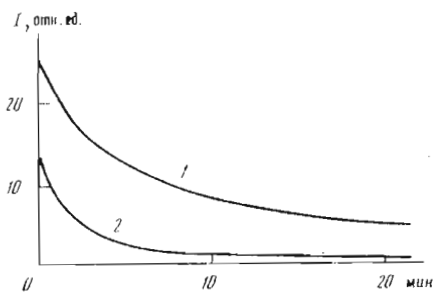


Рис. 3

ных растворах. (Для сравнения: Q антрацена в этанольном растворе составляет 28%.) Следует отметить значительное увеличение квантового выхода в водных растворах для производных пептидов по сравнению с аминокислотными производными.

С целью оценки возможности использования QMS-производных для идентификации аминов и аминокислот была изучена их флуоресценция на силикагеле в условиях тонкослойной хроматографии. При проявлении в системах, содержащих кислоту, QMS-производные приобретают яркую голубую флуоресценцию, обнаруживаемую вплоть до концентрации 10^{-11} моль в пятне (табл. 4). Характер флуоресценции на силикагеле по спектральным характеристикам (максимум испускания 440—470 нм) аналогичен флуоресценции в кислых растворах (pH 1) и, вероятно, обусловлен протонированием гетероциклического атома азота исследуемых соединений силанольными группами силикагеля наряду с протонированием кислотой, входящей в хроматографическую систему. По-видимому, флуоресцентные свойства 8-метокси-5-хинолинсульфонамидов обуславливаются не только гетероциклической системой 8-метоксихинолина, но и характером сульфонамидной группы, а именно наличием атома водорода при сульфонамидном атоме азота. Так, QMS-производное диэтиламина (IIr), у которого в сульфонамидной группе нет протона, имеет в водном растворе низкий квантовый выход (табл. 3) и не флуоресцирует на силикагеле. Аналогично ведут себя производные диметиламина (IIд), пирролидина (IIл) и пролина (IIн). Отсутствие флуоресценции у производных тирозина, триптофана и гистидина (IIIл, о, п) пока не находит объяснения. Возможно, это явление связано с внутримолекулярным тушением флуоресценции [14].

Флуоресценция MQS-производного (IIв) и соответствующего дансильного (Dns) производного на силуфоле * при проявлении в этаноле (а), системе Г (б) или 1 н. H₂SO₄ (в)

Количество вещества в пятне, моль	MQS=NHС ₂ H ₅ (IIв)			Dns=NHС ₂ H ₅		
	а (λ _{max} 440)	б (λ _{max} 450)	в (λ _{max} 470)	а (λ _{max} 430-450)	б (λ _{max} 530)	в (λ _{max} 430-450)
10 ⁻⁸	725	—	100	50	430	—
10 ⁻⁹	110	170	35	38	60	106
10 ⁻¹⁰	46	135	13	38	18	71
10 ⁻¹¹	21	95	8	0	0	53

* λ_{max} возбуждения 330 нм, область сканирования λ 350—600 нм, температура 20±2° С. Приведена интенсивность флуоресценции в относительных единицах при указанной λ_{max} испускания.

Флуоресцентные свойства и достаточная хроматографическая подвижность MQS-производных использованы нами для хроматографического анализа аминов и аминокислот. Хроматографию проводили на пластинках силуфола. Следует отметить, что для ряда аминокислот вследствие мало различающейся хроматографической подвижности не удалось подобрать оптимальных условий разделения. При хроматографировании в описанных условиях MQS-производные могут быть обнаружены сканированием в количествах до 10⁻¹¹ моль (табл. 4) и при практическом применении по пределам обнаружения не уступают соответствующим дансильным производным.

Под действием УФ-света MQS-производные теряют флуоресцентные свойства на силуфоле медленнее, чем соответствующие дансильные соединения (рис. 3) (ср. [15]). Период полураспада MQS-производных в 2,4 раза больше, чем у аналогичных дансильных соединений. Практически же флуоресценция сохраняется в течение длительного времени (месяцы).

В кислых условиях, например при обработке хроматограмм кислотой или при хроматографировании в системах, содержащих уксусную кислоту, флуоресценция MQS-производных заметно увеличивается (табл. 4).

Экспериментальная часть

8-Метоксихинолин, ч. (НПО «Биореактив»), дополнительно очищали перегонкой в вакууме, т. пл. 33—35° С. Контроль чистоты и идентификацию полученных соединений осуществляли одномерной хроматографией на силуфоле (ЧССР) в системах хлороформ — метанол, 6 : 1 (А), хлороформ — изопропанол — ацетонитрил, 5 : 1 : 2 (Б), ацетонитрил — 25% NH₄OH, 9 : 1 (В), бензол — этилацетат — уксусная кислота, 100 : 50 : 1 (Г). Вещества на хроматограммах обнаруживали по флуоресценции при УФ-облучении. Молярные коэффициенты поглощения получены на приборе Beckman Du-7 (табл. 2). Спектры флуоресценции сняты на приборе Hitachi F-4000 (Япония), кюветы 1 × 1 см (табл. 3, рис. 1, 2). Количественный анализ флуоресценции при хроматографировании осуществляли сканированием пятен флуоресцирующих соединений на пластинке с помощью хромоскана Hitachi-650. Инструментальные параметры: входная щель 1,5 нм, выходная щель 3 нм, скорость сканирования 240 нм/мин, постоянная времени 0,5 с, пределы сканирования 350—600 нм. Измеряли флуоресценцию пятна площадью 1 см². Для этого на старт наносили 0,5 мкл этанольного раствора 10⁻⁸ — 10⁻¹¹ моль вещества в пятне, проявляли в этаноле; для сканирования в кислых средах пластинку дополнительно проявляли в системе Г или в 1 н. водной H₂SO₄ (см. табл. 4). Квантовый выход рассчитывали по методике [13]. Спектры ПМР получены на спектро-

метре Tesla BS-567 (Чехословакия) (100 МГц) в CDCl_3 . Внутренний стандарт — тетраметилсилан. Данные элементного анализа соответствовали вычисленным значениям.

8-Метокси-5-хиолинсульфонилхлорид (I). К 23,3 г (0,2 моль) хлорсульфоновой кислоты при $-5 - 5^\circ \text{C}$ добавляли 3,2 г (0,02 моль) 8-метоксихиолина, перемешивали 1 ч при $0 - 15^\circ \text{C}$, охлаждали, осторожно выливали в смесь 120 г измельченного льда и 65 г NaHCO_3 , осадок без промедления отделяли и еще влажным экстрагировали на фильтре этилацетатом (4×50 мл). Экстракт сушили 15—20 мин безводным Na_2CO_3 , упаривали в вакууме и получали 4,12 г (80%) сульфонилхлорида (I), т. пл. $123 - 124^\circ \text{C}$ (гексан — бензол, 1 : 1). R_f 0,68 (система А), 0,25 (система Г). Неочищенный хлорид (I) иногда содержит примесь неидентифицированного вещества с R_f 0,15 (система Г), обладавшего желтой флуоресценцией. Найдено, %: С 47,8; Н 3,1; N 5,5. $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClNO}_3\text{S}$. Вычислено, %: С 47,4; Н 3,0; N 5,5. УФ-спектр: λ_{max} 310 нм, ϵ 4910 ± 40 (DMF). Спектр флуоресценции: λ_{max} возбуждения 310 нм, λ_{max} испускания 410 нм, Q $51 \pm 2\%$ (DMF). Спектр ПМР, м.д.: 4,17 (с) OCH_3 , 7,06 (д) 7-Н, 7,62 (м) 3-Н, 8,32 (ц) 6-Н, 8,0 (с) 4-Н, 9,15 (с) 2-Н.

MQS-производные аминов (IIa—л). К раствору 1 ммоль 8-метокси-5-хиолинсульфонилхлорида (I) в 1 мл хлороформа добавляли 2—4 ммоль соответствующего амина в 2 мл метанола, через 15 мин упаривали, остаток промывали водой и перекристаллизовывали из этанола. Соединения (IIa, б) получали с использованием водных растворов аммиака и метиламина.

MQS-производные аминокислот и дипептидов (IIIa—т). Раствор 1 ммоль сульфонилхлорида (I) в 1 мл ацетона добавляли к раствору 2 ммоль аминокислоты или дипептида в 0,5 мл 4% раствора NaHCO_3 , смесь выдерживали 30 мин при 20°C , добавляли 1 н. HCl до pH 5, отфильтровывали выпавшие MQS-производные, промывали небольшим количеством воды и этанола, высушивали и перекристаллизовывали из DMF. При необходимости нейтрализованный раствор концентрировали до начала кристаллизации, выпавшее вещество обрабатывали вышеописанным способом. Выходы и свойства соединений (IIa—л) и (IIIa—т) приведены в табл. 1.

Авторы выражают искреннюю благодарность Г. Е. Добрецову, Н. К. Куреку и Е. Н. Лапшину (Институт физико-химической медицины МЗ РСФСР) за помощь в проведении спектральных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е., Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. С. 9—25.
2. Seiler N., Wiechmann M. // Progress in Thin-Layer Chromatography. 1970. V. 1. P. 95—116.
3. Wiechmann M. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1977. B. 358. № 8. S. 967—980.
4. Chen R. F., Scott C., Trepman E. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 576. № 2. P. 440—455.
5. Фрайштат Д. М. Реактивы и препараты для микроскопии. М.: Химия. 1980. С. 416—417.
6. Шибнев В. А., Финногорова М. П., Газумен А. К., Полежаев Л. М. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. № 5. С. 610—617.
7. Carisano A. // J. Chromatogr. 1985. V. 318. № 1. P. 132—138.
8. Mettrione R. M. // J. Chromatogr. 1986. V. 363. № 2. P. 337—344.
9. Schulman S. G., Caronacchia A. C. // J. Amer. Chem. Soc. 1973. V. 95. № 9. P. 2763—2766.
10. Gershon H., McNeil M. W., Grefic A. T., Schulman S. G. // Anal. chim. acta. 1973. V. 63. № 2. P. 454—458.
11. Грачева И. Н., Прокофьев Е. П., Ковельман И. Р., Тоцкилкин А. И. // Химия гетероцикл. соед. 1985. № 8. С. 1065—1069.
12. Тоцкилкин А. И., Грачева И. Н., Давыдова Г. А., Ковельман И. Р., Кириллова С. И. 8-Метокси-5-хиолинсульфохлаорид как аналитический флуорогенный реагент для хроматографического определения аминов, аминокислот и пептидов и способ его получения. А. с. № 1074869 (СССР). Б. И. 1984. № 7. С. 87.
13. Parker C. A., Rees W. T. // Analyst. 1960. V. 85. № 1013. P. 578—600.

14. Forster T. // Modern Quantum Chemistry. Part III / Ed. Sinangly O. New York, London: Acad. Press, 1966. P. 93—95.
15. Pouchan M. J., Passeron E. J. // Anal. Biochem. 1975. V. 63. № 2. P. 585—591.

Поступила в редакцию
18.VII.1989

После доработки
11.I.1990

A. I. TOCHILKIN, I. N. GRACHYOVA

**8-METHOXY-5-QUINOLINESULPHONYL CHLORIDE, A NEW FLUOROGENIC
REAGENT FOR DETECTION OF AMINES AND AMINO ACIDS**

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences
of USSR, Moscow*

A new fluorogenic reagent, 8-methoxy-5-quinolinesulphonyl chloride, was synthesized. It forms intensively fluorescing sulphonylamide derivatives of primary amines, amino acids and peptides, which can be analysed by thin-layer chromatography on the pmole level.