



(11) FREMLÆGGELSESSKRIFT 142366

DANMARK



(51) Int. Cl.³ C 07 D 493/10
G 01 N 21/64
G 01 N 33/52

(21) Ansøgning nr. 6487/72 (22) Indleveret den 27. dec. 1972

(24) Løbedag 27. dec. 1972

(44) Ansøgningen fremlagt og
fremlæggelsesskriftet offentliggjort den 20. okt. 1980

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

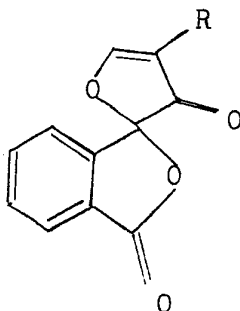
(30) Prioritet begæret fra den
27. dec. 1971, 212790, US
18. maj 1972, 254601, US
18. okt. 1972, 298682, US

-
- (71) F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AKTIENGESELLSCHAFT, Grenzacherstrasse 124-184, Postfach, CH-4002 Basel, CH.
- (72) Opfinder: Willy Leimgruber, Highland Avenue 166, Montclair, N.J., US:
Manfred Weigele, Andover Drive 4, North Caldwell, N.J., US.

- (74) Fuldmægtig under sagens behandling:
Plougmann & Vingtoft Patentbureau.

-
- (54) Spiro-(furan-2(3H),1'-phthalan)-3,3'-dioner til anvendelse i reagenser til bestemmelse af forbindelser indeholdende primære aminogruupper.

Den foreliggende opfindelse angår en hidtil ukendt klasse af forbindelser, nemlig spiro-[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dioner til anvendelse i reagenser til bestemmelse af forbindelser indeholdende primære aminogruupper og med den almene formel I



I

hvor R betegner alkyl med højst 8 carbonatomer, eventuelt med halogen eller med alkoxy med højst 8 carbonatomer substitueret phenyl eller naphthyl.

Efter omsætning med forbindelser indeholdende primære aminogrupeer bliver disse forbindelser med formlen I stærkt fluorescerende stoffer. De betegnes af denne grund som "fluorogener".

Betegnelsen "alkyl med højst 8 carbonatomer" angiver en monovalent, mættet, ligekædet eller forgrenet carbonhydridsubstituent. Udtrykket "alkoxy med højst 8 carbonatomer" angiver en alkylgruppe af den før nævnte art, som over et etheroxygenatom er bundet til molekylet. Udtrykket "eventuelt med halogen eller med alkoxy med højst 8 carbonatomer substitueret phenyl" angiver en phenylring, som kan være substitueret med én eller flere af følgende substituentter: halogen (fluor, chlor, brom eller iod), alkyl eller alkoxy som ovenfor defineret.

Anvendelsen af ninhydrin som et reagens til colorimetri ved påvisning og bestemmelse af aminosyrer, aminer og peptider har været kendt i ca. 60 år. De tjener som basis for den kendte "Stein-Moore"-teknik til automatisk bestemmelse af aminosyrer, som nu til dags er meget udbredt. McCaman og Robins beskriver en fluorometrisk metode til påvisning af serum-phenylalanin, hvor omsætningen mellem ninhydrin og phenylalanin benyttes, og de opdagede ved denne lejlighed, at fluorescensen blev kraftigt forstærket ved tilsætning af nogle peptider. Senere har Udenfriend et al, Anal. Biochem. 42, 222, 237 (1971) beskrevet en fluorometrisk bestemmelsesmetode for forbindelser, som indeholder primære aminogrupeer, især for peptider og aminosyrer. Denne bestemmelsesmetode beror på omsætningen mellem forbindelsen indeholdende en primær aminogruppe, ninhydrin og et aldehyd, fortrinsvis phenylacetaldehyd. Det har vist sig, at denne metode er mere virksom og følsom end "Stein-Moore"-teknikken og "McCaman-Robins"-metoden. Det har nu vist sig, at fluorogenerne med formlen I reagerer og danner stærkt fluorescerende materialer med forbindelser, som indeholder primære aminogrupeer, især med peptider, aminosyrer og biogene aminer, f.eks. catecholaminer. Derfor kan forbindelserne med formlen

I anvendes som stærkt følsomme reagenser til bestemmelse af forbindelser, som indeholder primære aminogruupper. Når forbindelserne med formelen I er stabile i vandigt miljø, kan påvisningen og bestemmelsen af forbindelser, som indeholder primære aminogruupper, udføres i samme slags medium, hvorved metoden er særlig egnet til praktiske formål. Dette er vigtigt især med hensyn til bestemmelsen af aminosyrer og peptider, som i almindelighed findes og analyseres i vandigt miljø.

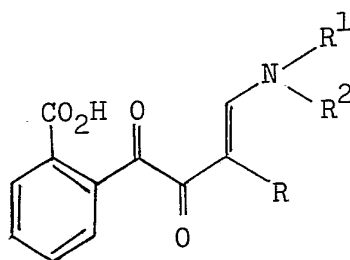
Eksempler på foretrukne forbindelser med formlen I er:

4-phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(2-methoxyphenyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(3-methoxyphenyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(4-methoxyphenyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(2,4-dimethoxyphenyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(2,5-dimethoxyphenyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(3,5-dimethoxyphenyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(3,4,5-trimethoxyphenyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(2,4,5-trimethoxyphenyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(3-chlorphenyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(4-chlorphenyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(4-bromphenyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(2-naphthyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(1-naphthyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion;
4-(1-propyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion.

Omsætningen mellem fluorogener med formlen I og forbindelser, som indeholder primære aminogruupper, er hurtig og kvantitativ. Omsætningen kan udføres over et bredt pH-værdiområde mellem ca. 4 og ca. 11. Hastigheden og fuldstændigheden for reaktionen mellem fluorogenet og forbindelsen indeholdende den primære aminogruppe er optimal inden for et pH-område mellem ca. 8 og 9. Således er f.eks. omsætningen mellem en forbindelse med formlen I og en simpel primær amin, f.eks. ethylamin, hurtigt løbet fuldstændigt til ende ved stuetemperatur og i dette pH-område.

Der foretrækkes især en forbindelse med formlen I, hvor R er phenyl, dvs. 4-phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion, da der med denne forbindelse særlig hurtigt opnås en intensiv fluorescens.

Forbindelserne med formlen I fremstilles ved behandling af forbindelser med den almene formel II

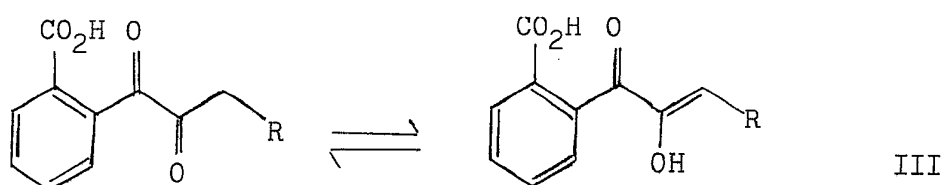


II

hvor R har den ovenfor anførte betydning, R^1 og R^2 hver for sig betegner lavere alkyl, eller R^1 og R^2 sammen med det nitrogenatom, til hvilket de er bundne, danner en 5- eller 6-leddet mættet heterocyclisk ring, som yderligere som heteroatom kan indeholde et nitrogenatom eller et oxygenatom, med et vandigt medium.

Enaminerne med formlen II kan direkte omdannes til forbindelserne med formlen I ved vandig hydrolyse ved neutral, sur eller basisk pH-værdi. Svarende dertil kan der i hydrolysemediet være en syre såsom en mineralsyre, f.eks. saltsyre, eller en svag base såsom et alkalimetalhydrogencarbonat, f.eks. natriumhydrogencarbonat. I almindelighed udføres den ovenfor omtalte hydrolyse fortrinsvis i nærværelse af en svag base, f.eks. et alkalimetalhydrogencarbonat. Efter fuldstændig udførelse af hydrolysen og syrning af reaktionsmediet (i de tilfælde, hvor hydrolysen er udført ved neutral eller basisk pH-værdi) fås de ønskede cycliserede forbindelser med formlen I. Hydrolysereaktionen udføres i temperaturområde mellem 0 og ca. 100°C. Et foretrukket temperaturområde ligger mellem 10 og 40°C. Der foretrækkes især stuetemperatur.

Forbindelserne med formlen II er hidtil ukendte. De fremstilles ved omsætning af en forbindelse med den almene formel III



hvor R har den ovenfor anførte betydning, med et amino-methenyle-ringsmiddel.

Egnede amino-methenyleringsmidler er f.eks. lavere alkylacetaler såsom N,N-disubstituerede formamider, f.eks. dimethylformamid-dimethylacetal; tris(sekundær amino)methaner, f.eks. tris(dimethylamino)methan og tris(piperidino)methan; og bis(sekundær amino)lavere alkoxy-methaner, f.eks. bis(dimethylamino)tert.butoxymethan.

Aminoresten $-N \begin{matrix} \diagup R^1 \\ \diagdown R^2 \end{matrix}$ som optræder i strukturformen for forbindelser-

ne med formlen II, indføres i molekylet ved hjælp af amino-methenyle-ringsmidlet. Acetaler af N,N-disubstituerede formamider har den alme-
ne formel IV

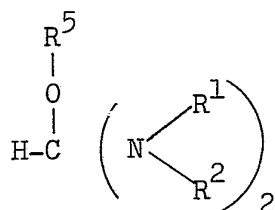


hvor R^3 og R^4 betegner lavere alkyl;
tris(sekundær amino)methaner har den almene formel V



og bis(sekundære amino)lavere alkoxyethaner har den almene formel

VI



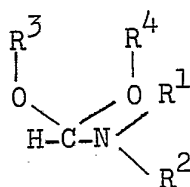
VI

hvor R^5 betegner lavere alkyl.

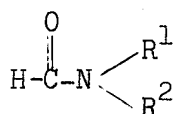
Eksempler på aminoresten $-\text{N} \begin{array}{l} \nearrow \text{R}^1 \\ \searrow \text{R}^2 \end{array}$ omfatter sådanne rester, hvor R^1 og

R^2 er lavere alkyl, f.eks. dimethylamino eller diethylamino, og sådanne, hvor R^1 og R^2 sammen med nitrogenatomet danner en 5- eller 6-leddet heterocyclisk ring, f.eks. piperidino, morpholino, pyrrolidino, piperazino, imidazolidino og pyrazolidino. Eksempler på en lavere alkoxygruppe OR^3 og OR^4 er methoxy, ethoxy, propoxy og n-butoxy. Eksempler på lavere alkoxygrupper OR^5 er methoxy, ethoxy og tert.butoxy.

Amino-methenyleringsreaktionen udføres i et inert organisk opløsningsmiddel. Foretrukne opløsningsmidler er f.eks. formamider, især dimethylformamid. Som opløsningsmiddel kan også anvendes et overskud af amino-methenyleringsmidlet. Ved en særlig foretrukken udførelsesform anvendes en acetal af et N,N-disubstitueret formamid,



som amino-methenyleringsmiddel og en opløsningsmiddelblanding, som består af et formamid med formlen

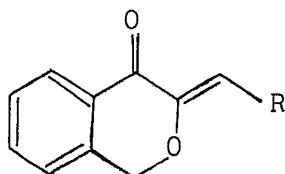


og en sekundær amin med formlen $\text{H}-\text{N} \begin{array}{l} \nearrow \text{R}^1 \\ \searrow \text{R}^2 \end{array}$. Ved en særlig foretrukken

udførelsesform anvendes N,N-dimethylformamid-dimethylacetalen i en opløsningsmiddelblanding bestående af N,N-dimethylformamid og dimethylamin. Ved udførelse af denne omsætning anvendes fortrinsvis ca. 1 - 5 mol sekundær amin pr. mol af forbindelsen med formlen III. Fremstillingen af enaminen kan udføres i et temperaturområde mellem ca. 0 og ca. 100°C; der foretrækkes dog et temperaturområde mellem 10 og 40°C. En særligt foretrukket reaktionstemperatur er stuetemperatur.

Forbindelserne med formlen III er hidtil ukendte og beskrives som eksisterende både i diketoformen og i den enoliserede form. Naturligvis afhænger forholdet mellem forbindelsernes tautomere af opløsningsmidlet, af temperaturen og pH-værdien. Af bekvemmelighedsgrunde nævnes og beskrives forbindelsen med formlen III i nærværende beskrivelse som enolformen.

Forbindelserne med formlen III fremstilles ved behandling af forbindelser med den almene formel VII

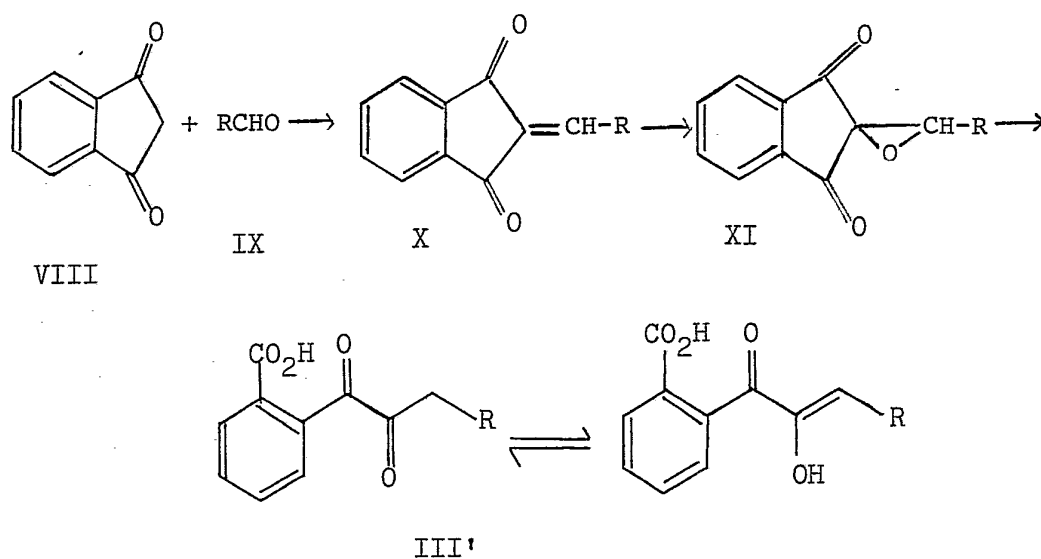


VII

hvor R har den ovenfor anførte betydning, med en base i vandigt miljø.

Forbindelserne med formlen VII er kendte og fremstilles ud fra en på tilsvarende måde substitueret o-acetyl-benzoesyre og et relevant aldehyd RCHO. Specielle forbindelser, som falder under formlen VII, og som ikke er beskrevet tidligere, kan fremstilles på nøjagtig samme måde som de kendte forbindelser.

Forbindelserne med formlen III kan endvidere fremstilles efter nedenstående reaktionsskema:



Det første trin i reaktionsforløbet består af kondensation af en 1,3-indandion med formlen VIII med et relevant lavere alkyl- eller arylaldehyd med formlen IX. Denne kondensation kan udføres på mange forskellige måder. Kondensationen af 1,3-indandion med benzaldehyd

blev allerede beskrevet af Ionescu, Bull. Soc. Chem. France, 1930, side 210. Ved denne kondensation anvendes natriumhydroxid i et alkoholisk opløsningsmiddel. Andre, til denne kondensationsreaktion særligt egnede reaktionsbetingelser er f.eks. standardbetingelserne for Knoevenagel-reaktion. Ved denne reaktion udføres kondensationen mellem 1,3-indandion og aldehydet i nærværelse af en sekundær organisk amin, hvorved samtidig det ved reaktionen dannede vand fjernes. Egnede sekundære aminer til denne kondensation er f.eks. ikke-cycliske aminer, f.eks. diethylamin, og cycliske aminer, f.eks. piperidin, morpholin eller pyrrolidin. I normale tilfælde anvendes kun katalytiske mængder, f.eks. 0,1 - 1,0 molprocent, af den sekundære amin. Egnede opløsningsmidler til kondensationsreaktionen er f.eks. sådanne, som danner azeotroper med vand, f.eks. benzen, toluen eller xylen. Det er hyppigt ønskværdigt som opløsningsmiddel eller co-opløsningsmiddel for et af de ovenfor anførte opløsningsmidler at anvende en aromatisk amin, f.eks. pyridin, eller en tertiær amin, f.eks. triethylamin. Fortrinsvis fjernes vandet fra reaktionsblandingen, enten ved azeotropisk destillation eller ved binding ved vandet til et passende middel, f.eks. en molekyllarsi.

Kondensationsreaktionen udføres i almindelighed ved forhøjet temperatur, fortrinsvis ved reaktionsblandings tilbagesvalingstemperatur. Hvis der tilstræbes azeotropisk fjernelse af vandet, udføres reaktionen hensigtsmæssigt ved eller nær ved reaktionsblandings tilbagesvalingstemperatur.

I næste trin epoxyderes alkylidenen eller arylidenindandionen med formelen X, og der fås epoxidet med formelen XI. Epoxideringen udføres ved hjælp af hydrogenperoxid i nærværelse af en basisk katalysator i ringe koncentration i et inert opløsningsmiddel.

I almindelighed anvendes der ved epoxideringsreaktionen molære mængder hydrogenperoxid. Der anvendes dog fortrinsvis også et ringe overskud af hydrogenperoxid, f.eks. 10 - 20% 's overskud.

Egnede inerte opløsningsmidler til epoxideringsreaktionen er f.eks. vand, lavere alkanoler såsom methanol og blandinger deraf.

Som basiske katalysatorer kan f.eks. anvendes alkalimetalhydroxider, f.eks. natriumhydroxid, eller et alkalimetalcarbonat, f.eks. natriumcarbonat. Mængden af den basiske katalysator ligger hensigtsmæssigt i

et område mellem ca. 0,1 og ca. 5 molprocent. Katalysatorens koncentration i reaktionsmediet skal holdes under 0,1 molær til undgåelse af en åbning af epoxidringen.

Temperaturen ved epoxideringsreaktionen ligger i almindelighed i et område mellem ca. 0 og ca. 25°C, fortrinsvis mellem 0 og 10°C.

Den rækkefølge, i hvilken reagenserne tilsættes, er ikke kritisk. I almindelighed foretrækkes det dog at sætte hydrogenperoxidet og den basiske katalysator til en forbindelse med formlen X. Især foretrækkes det at tilsætte den basiske katalysator langsomt som sidste reaktionskomponent for derved at få en mulighed for bedre kontrol af reaktionstemperaturen.

Omdannelsen af et epoxid med formlen XI til en forbindelse med formlen III' udføres ved hjælp af en særlig basisk opspaltningsreaktion i vandigt miljø, hvorved både epoxidringen og cyclopentandionringen opspaltes.

Egnede baser til denne opspaltningsreaktion er stærke baser, f.eks. alkalimetahydroxider såsom natriumhydroxid. Til opnåelse af maksimal omsætning er det nødvendigt at anvende 1 molækvivalent af en base, selv om der i almindelighed anvendes et molært overskud på 2 - 10 gange af basen. Koncentrationen af base i reaktionsblandingen ligger fortrinsvis over 0,5 molær og indtil ca. 5 molær; især foretrækkes det at den er ca. 2 molær.

Egnede opløsningsmidler er f.eks. vand og blandinger af vand med vand blandbare organiske opløsningsmidler, f.eks. lavere alkanoler såsom methanol eller ethanol eller ethere såsom tetrahydrofuran eller dioxan.

Opspaltningstemperaturen er ikke kritisk og kan ligge mellem ca. 0°C og reaktionsblandingsens tilbagesvalingstemperatur. Det foretrækkes i almindelighed at udføre omsætningen ved en temperatur mellem ca. 20 og ca. 40°C.

Reaktionsblandingen dannes i opløsning i form af alkalimetalsaltet. Forbindelsen med formlen III' isoleres fra reaktionsblandingen ved syrning af denne, hvorved syren frigøres fra det pågældende alkalime-

talsalt. Til denne syrning sættes der til reaktionsblandingen en syre, som er stærkere end syren med formlen III. Egnede syrer er f.eks. mineralsyrer såsom saltsyre og svovlsyre eller organiske sulfonsyrer såsom p-toluensulfonsyre. Den frie syre med formlen III kan derefter isoleres på sædvanlig måde, f.eks. ved ekstraktion og krystallisation.

De forskellige reaktionsmuligheder, som derefter fører til dannelse af en forbindelse med formel I, kan udføres under isolering og rensning af reaktionsproduktet på hvert fremgangsmådetrin eller fortrinsvis uden isolering og rensning af mellemprodukterne, idet kun slutproduktet, nemlig forbindelsen med formlen I, isoleres og renses.

Anvendelsen af en fluorogenforbindelse med formlen I til bestemmelse af forbindelser indeholdende primære aminogruupper har den fordel fremfor tidligere kendte metoder, som indebærer en ternær reaktion mellem en forbindelse indeholdende en primær aminogruppe, ninhydrin og phenylacetaldehyd, at reaktionen er binær. En yderligere fordel ved anvendelsen af forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse ligger i den kendsgerning, at blandingen af reagenser ved de tidligere kendte metoder nødvendigvis skal opvarmes til en temperatur på ca. 60°C i 15 - 30 minutter til opnåelse af den maksimale fluorescens. I modsætning hertil udvikler forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse øjeblikkeligt den maksimale fluorescens ved stuetemperatur. Den opnåede fluorescens' styrke ved anvendelse af forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse og samme koncentration af forbindelsen indeholdende primære aminogruupper er i almindelighed 10 - 50 gange stærkere end den, som opnås til sammenligning med de kendte fremgangsmåder. Således muliggør forbindelserne ifølge opfindelsen bestemmelsen af de mindste mængder af forbindelser indeholdende primære aminogruupper, idet der er omfattet koncentrationsområder, som tidligere ikke var tilgængelige for bestemmelse. Takket være den stærke følsomhed ved forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse kan små mængder peptider og aminosyrer, som f.eks. forekommer ved isolering fra et bestemt organ eller fra et enkelt forsøgsdyr, påvises og bestemmes.

Anvendelsen af de omhandlede forbindelser til bestemmelse af forbindelser indeholdende primære aminogruupper kan illustreres ved mange

forskellige muligheder. F.eks. kan tilstedeværelsen af en forbindelse, som indeholder en primær aminogruppe, påvises i en opløsning ved til en prøve at sætte et overskud af fluorogenet med formlen I ved den ønskede pH-værdi og måling af den dannede fluorescens. Fortrinsvis tilsættes den vandige opløsning, som indeholder forbindelsen indeholdende den primære aminogruppe, en opløsning af fluorogenet i et aprot, med vand blandbart opløsningsmiddel, f.eks. acetonitril, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, tetrahydrofuran eller dioxan. Det foretrækkes især at anvende et 10 - 5000 ganges molært overskud af fluorogenet. Det er særligt foretrukket at anvende en 50 - 1000 ganges molært overskud.

Forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse kan endvidere anvendes til bestemmelse af tilstedeværelsen af en forbindelse, som indeholder en primær aminogruppe, især aminosyrer på papirchromatografiske eller tyndtlagschromatografiske systemer. Ved en sådan teknik appliceres forbindelsen i et opløsningsmiddel, fortrinsvis et flygtigt organisk opløsningsmiddel, om ønsket i nærværelse af en pH-puffer, på chromatografisystemet, sædvanligvis i form af en spray, og systemet undersøges derefter under en fluorescenslyskilde. Udviklingen af fluorescens foregår hurtigt ved stuetemperatur, og der er derfor intet behov for opvarmning af chromatogrammet til udvikling af fluorescensen. Herved har denne metode en betydelig fordel i forhold til de tidligere kendte metoder.

En yderligere anvendelsesmåde af forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse ligger i anvendelsen deraf i automatiseret analyseudstyr til bestemmelse af aminosyrer. Ved en sådan metode blandes en prøvestrøm, som er en del af et udstrømmende eluat fra et chromatografisk system, med en forbindelse med formlen I ved ønsket pH-værdi, og blandingen analyseres straks ved hjælp af et spektrofluorometer. På denne måde viser fluorescensoptegnelser, som den kontinuerligt flydende prøvestrøm forårsager, tilstedeværelsen og koncentrationen af forskellige aminosyrer.

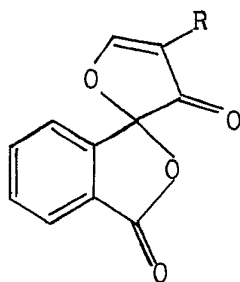
Opfindelsen illustreres i nedenstående eksempler:

Eksempel 1.

Til en opløsning af 20 g 3-benzyliden-4-keto-3,4-dihydroisocumarin opløst i 400 ml methanol sættes 100 ml 1N vandig natriumhydroxidopløsning. Blandingen omrøres i 30 minutter ved stuetemperatur. Derefter fortyndes den med vand og syrnes med 10%^s saltsyreopløsning. Den udfældede o-(α -hydroxycinnamoyl)benzoesyre ekstraheres to gange med chloroform. De organiske ekstrakter vaskes med vand og tørres over natriumsulfat, og opløsningsmidlet afdampes under reduceret tryk. Den tørre remanens opløses i 80 ml dimethylformamid. Opløsningen afkøles til 0°C, og under omrøring tilsættes 24 ml tris-(dimethylamino)methan. Omrøringen fortsættes ved stuetemperatur i 60 minutter. 1-Dimethylamino-2-phenyl-4(o-carboxyphenyl)-1-buten-3,4-dionet, som er dannet, isoleres ikke, men dimethylformamidopløsningen hældes ud i isvand. Den resulterende vandige alkaliske opløsning ekstraheres med ether. Etherekstrakten kasseres, og den vandige fase syrnes med fortyndet saltsyre. Det ønskede 4-phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion ekstraheres tre gange med ether/benzen (1:1). De samlede ekstrakter tørres over natriumsulfat og indampes under reduceret tryk. Den krystallinske remanens suspenderes i ether og frafiltreres. Der fås 12 g rent stof med smeltepunkt 153°C.

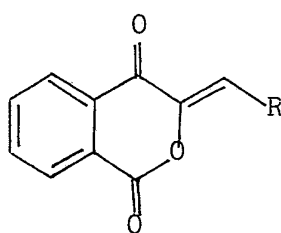
De i den nedenfor anførte tabel I anførte forbindelser fremstilles som ovenfor beskrevet, idet der anvendes den relevante 3-aryliden- eller 3-alkyliden-4-keto-3,4-dihydroisocumarin, som er anført i nedenstående tabel II, som udgangsmateriale.

Tabel I



R =	Smp.	Sumformel
2-Methoxyphenyl	153°C	$C_{18}H_{12}O_5$
3-Methoxyphenyl	118°C	$C_{18}H_{12}O_5$
4-Methoxyphenyl	158°C	$C_{18}H_{12}O_5$
2,4-Dimethoxyphenyl	133°C	$C_{19}H_{14}O_6$
2,5-Dimethoxyphenyl	148°C	$C_{19}H_{14}O_6$
3,5-Dimethoxyphenyl	138°C	$C_{19}H_{14}O_6$
3,4,5-Trimethoxyphenyl	205°C	$C_{20}H_{16}O_7$
2,4,5-Trimethoxyphenyl	179°C	$C_{20}H_{16}O_7$
3-Chlorphenyl	144°C	$C_{17}H_9ClO_4$
4-Chlorphenyl	167°C	$C_{17}H_9ClO_4$
4-Bromphenyl	181°C	$C_{17}H_9BrO_4$
2-Naphthyl	170°C	$C_{21}H_{12}O_4$
1-Naphthyl	191°C	$C_{21}H_{12}O_4$
n-Propyl	Olie	$C_{14}H_{12}O_4$

Tabel II



R =	Smp.	Sumformel
2-Methoxyphenyl	200°C	$C_{17}H_{12}O_4$
3-Methoxyphenyl	153°C	$C_{17}H_{12}O_4$
4-Methoxyphenyl	200°C	$C_{17}H_{12}O_4$

Tabel II fortsat

2,4-Dimethoxyphenyl	201°C	C ₁₈ H ₁₄ O ₅
2,5-Dimethoxyphenyl	160°C	C ₁₈ H ₁₄ O ₅
3,5-Dimethoxyphenyl	178°C	C ₁₈ H ₁₄ O ₅
3,4,5-Trimethoxyphenyl	144°C	C ₁₉ H ₁₆ O ₆
2,4,5-Trimethoxyphenyl	210°C	C ₁₉ H ₁₆ O ₆
3-Chlorphenyl	224°C	C ₁₆ H ₉ ClO ₃
4-Chlorphenyl	203°C	C ₁₆ H ₉ ClO ₃
4-Bromphenyl	204°C	C ₁₆ H ₉ BrO ₃
2-Naphthyl	251°C	C ₂₀ H ₁₂ O ₃
1-Naphthyl	184°C	C ₂₀ H ₁₂ O ₃
n-Propyl	58°C	C ₁₃ H ₁₂ O ₃

Eksempel 2.

Til en opløsning af 12,5 g 3-benzyliden-4-keto-3,4-dihydroisocumarin, fremstillet efter den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde, i 200 ml methanol sættes 50 ml 1N vandig natriumhydroxidopløsning. Reaktionsblandingen omrøres ved stuetemperatur i 90 minutter. Derefter hældes den ud på is, og den resulterende vandige blanding syrnes med 50 ml 1N saltsyreopløsning. Der ekstraheres fire gange med methylenchlorid. Ekstrakterne sammenhældes, tørres over natriumsulfat og indampes i vakuum. Remanensen, som indeholder o-(α-hydroxycinnamoyl)benzoesyre, opløses i 150 ml dimethylformamid. Til denne opløsning sættes 30 g tris(piperidino)methan. Blandingen omrøres ved stuetemperatur i 5 timer, hvorefter opløsningen, som indeholder 1-(1-piperidino)-2-phenyl-4-(o-carboxyphenyl)-1-buten-3,4-dion, hældes ud på isvand. Den alkaliske vandige blanding ekstraheres med ether, og etherekstrakten kasseres. Den vandige fase syrnes med 300 ml 1N saltsyre og ekstraheres fire gange med methylenchlorid. De organiske ekstrakter sammenhældes, vaskes med vand, tørres over natriumsulfat og indampes til tørhed under reduceret tryk. Remanensen opløses i 75 ml methylenchlorid og behandles med 1 g aktivkul ved tilbagesvalingstem-

peratur. Den varme opløsning filtreres. Filtratet inddampes til 50 ml og fortyndes derefter med 100 ml ether. Af blandingen krystalliserer 8,4 g 4-phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion med smeltepunkt 151 - 153°C.

De i tabel I anførte forbindelser fremstilles på analog måde, idet der som udgangsmateriale anvendes de i tabel II anførte relevante 3-aryliden- eller 3-alkyliden-4-keto-3,4-dihydroisocumariner.

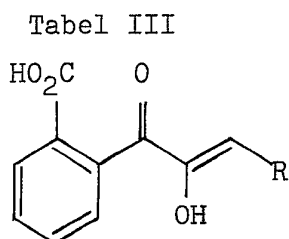
Eksempel 3.

Til en opløsning af 268 mg o-(α -hydroxycinnamoyl)benzoesyre i 5 ml dimethylformamid sættes 2 ml dimethylformamid-dimethylacetat. Reaktionsblandingen lades henstå ved stuetemperatur i 17 timer. Opløsningen, som indeholder 1-dimethylamino-2-phenyl-4(o-carboxyphenyl)-1-buten-3,4-dion, hældes derefter ud på vand og syrnes med fortyndet saltsyre. Blandingen ekstraheres med methylenchlorid, og den organiske ekstrakt tørres over natriumsulfat og inddampes i vakuum. Den således koncentrerede opløsning hældes på en kort søjle, som er fyldt med 4,5 g silicagel, og elueres med methylenchlorid. Eluatet inddampes i vakuum, og remanensen omkrystalliseres af methylenchlorid/ether. Der fås 110 mg 4-phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion med smeltepunkt 151 - 154°C.

Udgangsmaterialet kan fremstilles på følgende måde:

Til en suspension af 2,5 g 3-benzyliden-4-keto-3,4-dihydroisocumarin (fremstillet som beskrevet i eksempel 1) i 50 ml methanol sættes 10 ml 1N vandig natriumhydroxidopløsning. Blandingen omrøres i 1 time ved stuetemperatur. Der fås en mørkerød opløsning. Opløsningen fortyndes med vand, syrnes med 10 ml 1N saltsyre og ekstraheres tre gange med methylenchlorid. De organiske ekstrakter sammenhældes, vaskes med vand, tørres over natriumsulfat og inddampes i vakuum ved 20 - 30°C. Remanensen opløses i methylenchlorid ved stuetemperatur. Til opløsningen sættes petroleumsether, indtil der indtræder en uklarhed. Blandingen lades henstå i 16 timer ved stuetemperatur, hvorefter den ønskede og i mellemtiden udkrystalliserede syre frafiltreres. Krystallerne vaskes på filteret med methylenchlorid/petroleumsether (1:9) og tørres i vakuum. Der fås 2 g o-(α -hydroxycinnamoyl)benzoesyre med smeltepunkt 99 - 105°C.

De i nedenstående tabel III anførte forbindelser fremstilles analogt med ovenstående fremgangsmåde under anvendelse af de tilsvarende i tabel II anførte 3-aryliden-4-keto-3,4-dihydroisocumariner som udgangsmateriale.



R =	Smp.	Sum formel
2-Methoxyphenyl	131 - 136°C	C ₁₇ H ₁₄ O ₅
3-Methoxyphenyl	133 - 135°C	C ₁₇ H ₁₄ O ₅
4-Methoxyphenyl	117 - 123°C	C ₁₇ H ₁₄ O ₅
2,5-Dimethoxyphenyl	131 - 132°C	C ₁₈ H ₁₆ O ₆
3,5-Dimethoxyphenyl	131 - 134°C	C ₁₈ H ₁₆ O ₆
2,4,5-Trimethoxyphenyl	152 - 165°C	C ₁₉ H ₁₈ O ₇
3-Chlorphenyl	117 - 117°C	C ₁₆ H ₁₁ ClO ₄
4-Bromphenyl	130 - 132°C	C ₁₆ H ₁₁ BrO ₄
1-Naphthyl	154 - 160°C	C ₂₀ H ₁₄ O ₄

Eksempel 4.

Til en opløsning af 4,47 g o-(α-hydroxy-2-methoxycinnamoyl)benzoesyre (fremstillet efter den i eksempel 3 beskrevne fremgangsmåde) i 30 ml dimethylformamid sættes 5 g tris(dimethylamino)methan. Blandingen omrøres i 3 1/2 time ved stuetemperatur. Størstedelen af den overskydende mængde formyleringsmiddel og opløsningsmidlet fjernes under reduceret tryk ved 55 - 60°C. Remanensen, som indeholder 1-dimethylamino-2-(o-methoxyphenyl)-4-(o-carboxyphenyl)-1-buten-3,4-dion, opløses igen i 10 ml dimethylformamid, og denne opløsning hældes i 100 ml vand. Den resulterende alkaliske blanding ekstraheres med me-

thylenchlorid. De organiske ekstrakter kasseres, og den vandige fase syrnes med fortyndet saltsyre og ekstraheres to gange med methylenchlorid. De organiske faser sammenhældes, vaskes med vand, tørres over natriumsulfat og inddampes til tørhed under reduceret tryk. Den som remanens vundne olie opløses i ether. Efter afkøling udfælder krystaller fra etheropløsningen. Disse frafiltreres, og der fås 2,4 g 4-(2-methoxyphenyl)spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion med smeltepunkt 152 - 154°C.

De i tabel III anførte forbindelser omdannes på analog måde til de tilsvarende spirolactoner, som er anført i tabel I.

Eksempel 5.

Til en opløsning af 16,08 g (0,06 mol) o-(α -hydroxycinnamoyl)benzoesyre (fremstillet efter den i eksempel 3 angivne arbejdsforskrift) i 60 ml 2N dimethylaminopløsning i dimethylformamid (fremstillet ved fortynding af 90 g dimethylamin med dimethylformamid til 1 liter ved 0°C) sættes under omrøring 30 ml N,N-dimethylformamid-dimethylacetal. Den resulterende blanding, som indeholder 1-dimethylamino-2-phenyl-4(o-carboxyphenyl)-1-buten-3,4-dion, lades henstå i 2 timer ved stuetemperatur. Den hældes derefter ud i 500 ml isvand. Den vandige opløsning syrnes forsigtigt med 10%’s saltsyreopløsning til pH-værdi 4. Den resulterende suspension ekstraheres tre gange med 600 ml ether/benzen (1:1). Ekstrakterne sammenhældes og vaskes med 500 ml 1%’s vandig natriumhydrogencarbonatopløsning og til sidst med vand. Den organiske opløsning tørres over natriumsulfat og inddampes under reduceret tryk. Den fasteremanens opløses i 50 ml varmt methylenchlorid, og opløsningen fortyndes med 120 ml ether. Ved afkøling fås 9,03 g 4-phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion i form af hvide krystaller, som smelter ved 154 - 155°C. Der fås yderligere 1,54 g produkt med samme renhed ved inddampning af moderluden og tilsætning af ether. De i tabel III anførte forbindelser kan på analog måde omdannes til de tilsvarende spirolactoner, som er anført i tabel I.

Eksempel 6.

Fluorometrisk bestemmelse.

Fremgangsmåde:

I et reagensglas hældes:

- a) 1 ml peptidopløsning (20 nanomol leucyl-alanin i 1 ml phosphatpuffer med pH-værdi 8) og
- b) 2 ml pufferopløsning (Fischer) med pH-værdi 8. Under blanding ved hjælp af en "Vibro"-blander tilsættes hurtigt:
- c) 1 ml reagensopløsning (indeholdende 0,2 millimol af en spirolacton ifølge tabel I i 100 ml acetonitril).

Der fås de nedenfor anførte koncentrationsforhold:

Leucyl-alanin:	5 nanomol/ml
Reagens:	0,5 nanomol/ml (100 ganges overskud)
Acetonitril:	25%
Vandig puffer:	75%.
Fluorescensen måles straks.	

Måleinstrument:

"Farrand" spektrofluorometer	
Impuls:	390 nm.; spalte 10,10
Fluorescensstråling:	385 nm.; spalte 20,20
Følsomhed =	1

Resultater:

Med 4-phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion som reagens fås en fluorescensintensitet på 80 beregnet i forhold til en fluorescensintensitet på 70 (ved samme impuls- og fluorescensstråling) for en quiniinstandard, 10 mg/ml 0,01N svovlsyre.

Det ovenfor beskrevne eksperiment gentages, idet der i stedet for leucyl-alanin anvendes ethylamin og ethanol i stedet for acetonitril. Den målte fluorescensintensitet, som fås ved anvendelse af de forskellige spirolactonreagenser ifølge tabel I, er anført i tabel IV. Fluorescensintensiteten, som fås ved anvendelse af 4-phenylspiro[furan-2-(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion, er vilkårligt tildelt værdien 100, og de øvrige intensiteter er beregnet ud fra denne værdi.

Tabel IV

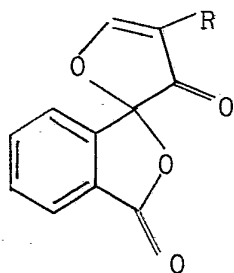
Forbindelse fra tabel I R =	$\lambda_{\max}$ An.	Flstr.	Relativ fluorescens- intensitet
Phenyl	390	475	100
3-Methoxyphenyl	391	475	115
4-Methoxyphenyl	395	495	110
3,5-Dimethoxyphenyl	390	475	120
4-Chlorphenyl	390	475	110
1-Naphthyl	310	483	94
3,4,5-Trimethoxyphenyl	390	475	60
n-Propyl	370	445	47

An = impulsstråling

Flstr. = fluorescensstråling.

Patentkrav.

1. Spiro-[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dioner til anvendelse i reagenser til bestemmelse af forbindelser indeholdende primære aminogruupper,
k e n d e t e g n e t ved, at de har den almene formel I



I

hvor R betegner alkyl med højst 8 carbonatomer, eventuelt med halogen eller med alkoxy med højst 8 carbonatomer substitueret phenyl eller naphthyl.

2. Spiro-[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den er 4-phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion.

Fremdragne publikationer:
