

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-196683

(P2004-196683A)

(43) 公開日 平成16年7月15日(2004.7.15)

(51) Int.Cl.⁷

C07D 215/22

G01N 21/78

F I

C O 7 D 215/22

G O 1 N 21/78

C

テーマコード (参考)

2 G O 5 4

4 C O 3 1

審査請求 未請求 請求項の数 18 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2002-364790 (P2002-364790)

(22) 出願日 平成14年12月17日 (2002.12.17)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年12月
1日 社団法人日本薬学会九州支部発行の「第19回日
本薬学会九州支部大会講演要旨集」に発表

(71) 出願人 800000035

株式会社産学連携機構九州

福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号

(74) 代理人 100087675

弁理士 筒井 知

(72) 発明者 財津 潔

福岡県福岡市東区香椎6丁目13番11号

(72) 発明者 濱瀬 健司

福岡県古賀市今の庄2丁目24番10-8
02号

(72) 発明者 富田 辰之介

福岡県福岡市中央区黒門9丁目1番

Fターム(参考) 2G054 AA07 BB01 CA21 CE01 EA03
4C031 EA18

(54) 【発明の名称】 キノリンオキシド誘導体およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 哺乳類における内因性メラトニン含量は極微量であり、しかも従来の分析法は感度が低いので、メラトニンを分析するために被験者の負担になる程度の量の血液が必要であった。この発明はできるだけ微量の採血でメラトニンの量を分析・測定できるようにした高感度なメラトニンの分析手段を提供すること、ならびに強い蛍光を有するキノリンオキシド誘導体を提供すること。

【解決手段】 一般式 [IV] で示されるメラトニンなどのインドール誘導体を酸化して得られた一般式 [I] で示されるキノリンオキサイド誘導体は、その蛍光強度を測定することによって、メラトニンならびにインドール誘導体の量を測定することができる。

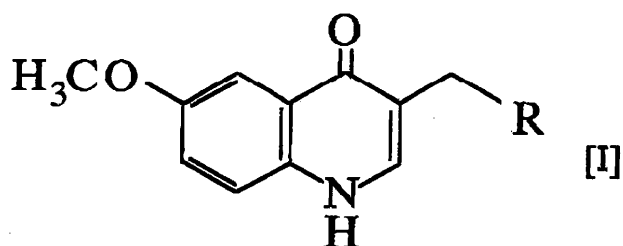
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 [I] :

【化 1】



10

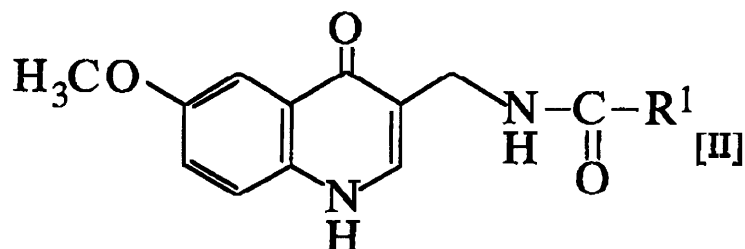
(式中、Rはアミノ基、アルキルアミド基、カルボキシ基、カルボキシレート基、チオール基またはジスルフィド結合を意味する。)

で表されるキノリンオキシド誘導体であることを特徴とするキノリンオキシド誘導体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載する キノリンオキシド誘導体において、前記キノリンオキシド誘導体が一般式 [II] :

【化 2】



20

(式中、R¹ はアルキル基を意味する。)

で表されるキノリンオキシド誘導体であることを特徴とするキノリンオキシド誘導体。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載するキノリンオキシド誘導体において、前記アルキル基が、炭素原子数が 1 ないし 6 の、直鎖状もしくは分岐鎖状の 1 価飽和脂肪族炭化水素残基を意味することを特徴とするキノリンオキシド誘導体。

30

【請求項 4】

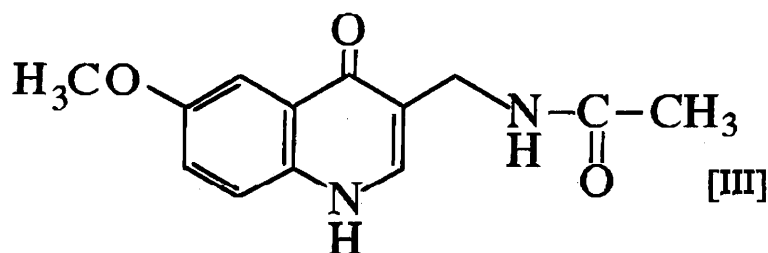
請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載するキノリンオキシド誘導体において、前記アルキル基が、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基または第三級ブチル基を意味することを特徴とするキノリンオキシド誘導体。

【請求項 5】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載するキノリンオキシド誘導体において、該キノリンオキシド誘導体が式 [III] :

40

【化 3】



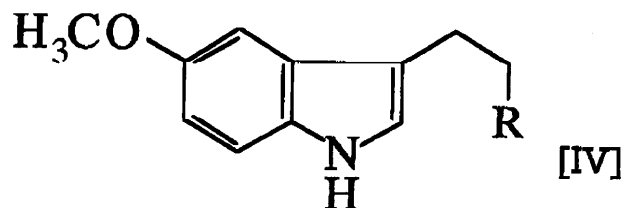
で表されるキノリンオキシドであることを特徴とするキノリンオキシド誘導体。

50

【請求項 6】

一般式 [IV] :

【化 4】

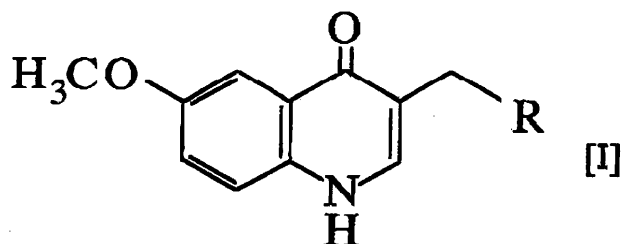


10

(式中、Rはアミノ基、アルキルアミド基、カルボキシ基、カルボキシレート基、チオール基またはジスルフィド結合を意味する。)

で表されるインドール誘導体を酸化して、一般式 [I] :

【化 5】



20

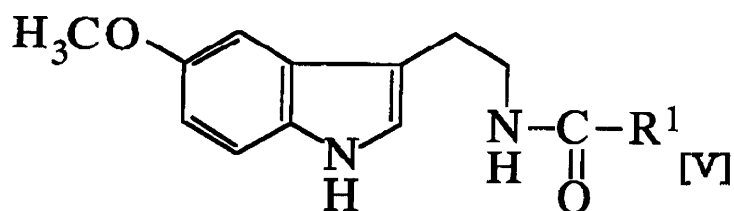
(式中、Rは前記と同じ意味を有する。)

で表されるキノリンオキシド誘導体を得ることを特徴とするキノリンオキシド誘導体の製造方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載するキノリンオキシド誘導体の製造方法において、前記インドール誘導体が一般式 [V] :

【化 6】

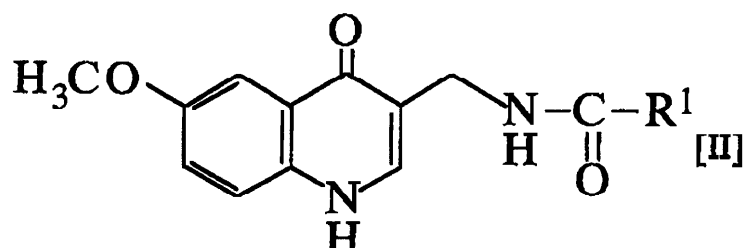


30

(式中、R¹ はアルキル基を意味する。)

で表されるインドール誘導体であり、該インドール誘導体を酸化して一般式 [II] :

【化 7】



40

(式中、R¹ は前記と同じ意味を有する。)

50

で表されるキノリンオキシド誘導体を得ることを特徴とするキノリンオキシド誘導体の製造方法。

【請求項 8】

請求項 6 または 7 に記載するキノリンオキシド誘導体の製造方法において、前記アルキル基が、炭素原子数が 1 ないし 6 の、直鎖状もしくは分岐鎖状の 1 価飽和脂肪族炭化水素残基を意味することを特徴とするキノリンオキシド誘導体の製造方法。

【請求項 9】

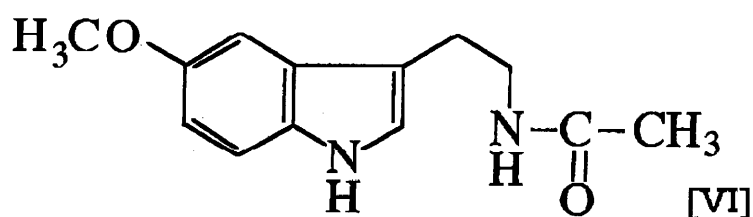
請求項 6 ないし 8 のいずれか 1 項に記載するキノリンオキシド誘導体の製造方法において、前記アルキル基が、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基または第三級ブチル基を意味することを特徴とするキノリンオキシド誘導体の製造方法。

10

【請求項 10】

請求項 6 ないし 9 のいずれか 1 項に記載するキノリンオキシド誘導体の製造方法において、前記インドール誘導体が式 [VI] :

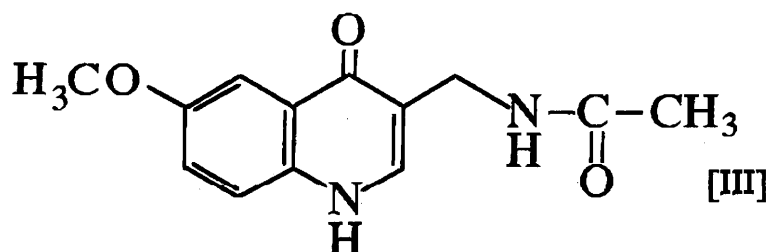
【化 8】



20

で表されるメラトニンであり、前記メラトニンを酸化して式 [III] :

【化 9】



30

で表されるキノリンオキシドを得ることを特徴とするキノリンオキシド誘導体の製造方法。

【請求項 11】

請求項 6 ないし 10 のいずれか 1 項に記載するキノリンオキシド誘導体の製造方法において、該インドール誘導体をアルカリ性下において酸化することを特徴とするキノリンオキシド誘導体の製造方法。

【請求項 12】

請求項 6 ないし 11 のいずれか 1 項に記載するキノリンオキシド誘導体の製造方法において、該キノリンオキシド誘導体を有機溶媒で抽出することを特徴とするキノリンオキシド誘導体の製造方法。

40

【請求項 13】

請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載する一般式 [I] もしくは [II] または式 [II] で表されるキノリンオキシド誘導体の蛍光強度を測定することを特徴とするキノリンオキシド誘導体の分析方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載するキノリンオキシド誘導体の分析方法において、内標準物質を加えることを特徴とするキノリンオキシド誘導体の分析方法。

【請求項 15】

50

請求項 6 ないし 1 2 のいずれか 1 項に示す酸化反応によって、一般式 [IV] もしくは [V] または式 [VI] で表されるインドール誘導体を酸化して、一般式 [I] もしくは [II] または式 [II] で表されるキノリンオキシド誘導体を得る酸化部と、該キノリンオキシド誘導体の蛍光強度を測定してキノリンオキシド誘導体の量を求める測定部とを備えていることを特徴とするキノリンオキシド誘導体の分析装置。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載するキノリンオキシド誘導体の分析装置において、前記酸化部で得られた反応生成物から該キノリンオキシド誘導体を有機溶媒で抽出し、抽出した該キノリンオキシド誘導体を前記測定部に供給する抽出部を備えていることを特徴とするキノリンオキシド誘導体の分析装置。

10

【請求項 1 7】

請求項 1 5 または 1 6 に記載するキノリンオキシド誘導体の分析装置において、内標準物質を加える添加部を更に備えていることを特徴とするキノリンオキシド誘導体の分析装置。

【請求項 1 8】

請求項 1 5 ないし 1 7 のいずれか 1 項に記載するキノリンオキシド誘導体の分析装置において、前記測定部がヒーター及び高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を備えていることを特徴とするキノリンオキシド誘導体の分析装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

20

【発明の属する技術分野】

この発明は、キノリンオキシド誘導体およびその製造方法に関するものであり、更に詳細には、蛍光特性を有するキノリンオキシド誘導体およびその製造方法に関するものである。また、この発明はキノリンオキシド誘導体が発する強い蛍光を利用したキノリンオキシド誘導体の分析方法およびその分析装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

急速に都市化、情報化の進んだ現代社会は 24 時間化しており、人々のライフスタイルの多様化と共に睡眠覚醒症候群を含む生体リズム障害が急増している。これらの疾患は成人の社会生活を困難とし、幼児期、高齢者においては生活支援者の生活にも重大な問題を生じる。

30

【0003】

また、このリズム障害は投与薬物の副作用の減弱と薬効の増強を目的とする時間治療、すなわち薬物投与のタイミングを最適化する治療の導入を困難とし、様々な疾患において治療法に制限を与える。

【0004】

更にまた、例えば、未熟児や新生児の医療現場におけるような微量の試料しか採取できない場合において、生体成分や薬物などの微量分析が要請されるときには、蛍光分析法が広く利用されている。特に誘導体化試薬を用いる蛍光誘導体化法はそれ自体吸収や蛍光を持たない様々な分析対象に対して高感度かつ選択的な分析を可能にする極めて有効な手段であるといえる。

40

【0005】

また、これまで蛍光標識を目的として DNS-C1、NBD-F などの数多くの優れた試薬が開発されているけれども、これらの蛍光標識試薬にしても、安定性、感度、溶解性などにおいて問題を有するものも少なくない。例えば、DNS 誘導体は感度が不足するという欠点、また NBD 誘導体は光で分解されるという問題を有している。更に、当然のことながら、それらの蛍光標識試薬を用いた分析法や分析装置も問題を有する結果になっている。

【0006】

上記したようなリズム障害に対する著効な薬として、また生体リズムのマーカーとして、

50

松果体から血液中に分泌されるホルモンであるメラトニンが最近注目されている。このメラトニンは、松果体においてL-トリプトファンからセロトニン、N-アセチルセロトニンを経て生合成されるインドールホルモンであり、夜間に生合成、分泌が亢進するという顕著な概日リズムを示すことが知られている。

【0007】

したがって、このような作用を有するメラトニンの血中濃度を正確に測定することは重要である。

現在、メラトニンの分析方法として知られている方法としては、例えば、メラトニン自身の持つ蛍光を測定してメラトニンの量を求める自然蛍光法や、放射線ラベル体を使用してメラトニンの量を求めるラジオイムノアッセイ（RIA）がある。

10

【0008】

ところで、哺乳類における内因性メラトニンの含量は、極めて微量であり、上述した従来の分析法では、メラトニンなどのインドール誘導体の血中濃度を測定するためには数ミリリットルの血液が必要であった。このためには注射による静脈採血が必要であり、被験者に多大な負担を与えることから、特に頻繁に採血が必要な概日リズム測定などには適当でなく、患者に対してはより負担が少なくかつメラトニンなどのインドール誘導体の血中濃度をより正確に測定する方法が要望されていた。

【0009】

また、RIAは、ラジオアイソトープを使用しなければならないので、取り扱いが危険であり、特別の施設が必要である。したがって、このようなRIAを使用しないで、インドール誘導体の血中濃度をより正確に測定する方法が要望されていた。

20

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明者らは、従来方法を改良すべく鋭意検討研究した結果、メラトニンの酸化体であるメラトニンオキシドの蛍光を測定することによってメラトニンなどのインドール誘導体の血中濃度をより正確に測定することができることを見出して、この発明を完成するに至った。

【0011】

【課題を解決するための手段】

したがって、この発明は、メラトニンなどのインドール誘導体の血中濃度をより正確に測定することができる蛍光性を有するキノリンオキシド誘導体を提供することを主な目的とする。

30

また、この発明は、強い蛍光性を有し、蛍光標識試薬の母核となり得るキノリンオキシド誘導体の製造方法を提供することを別の目的としている。

【0012】

更に、この発明は、できるだけ微量の採血でメラトニンなどのインドール誘導体の量を分析・測定できるようにした高感度なキノリンオキシド誘導体の分析方法と、キノリンオキシド誘導体の分析装置を提供することを別の目的とする。

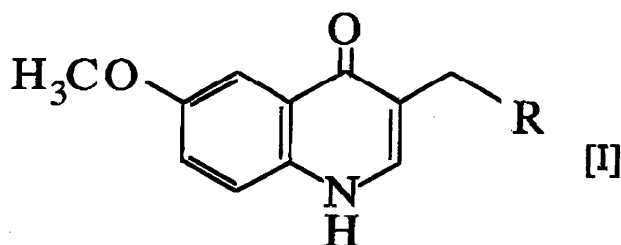
【0013】

上記目的を達成するために、この発明は、一般式〔I〕：

40

【0014】

【化10】



50

【0015】

(式中、Rはアミノ基、アルキルアミド基、カルボキシ基、カルボキシレート基、チオール基またはジスルフィド結合を意味する。)

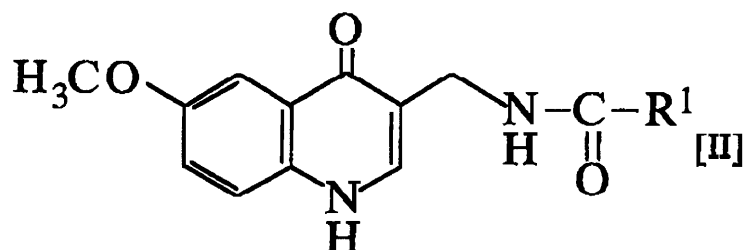
で表されるキノリンオキシド誘導体を提供する。

【0016】

また、この発明に係るキノリンオキシド誘導体は、その好ましい1態様として、一般式 [II] :

【0017】

【化11】



10

(式中、R¹はアルキル基を意味する。)

で表されるキノリンオキシド誘導体を提供する。この発明の更に好ましい態様としては、一般式 [I] または一般式 [II] におけるアルキル基が、炭素原子数が1ないし6の、直鎖状もしくは分岐鎖状の1価飽和脂肪族炭化水素残基を意味するキノリンオキシド誘導体が提供される。より好ましい1態様として、一般式 [I] または一般式 [II] におけるアルキル基が、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基または第三級ブチル基を意味することを特徴とするキノリンオキシド誘導体が提供される。

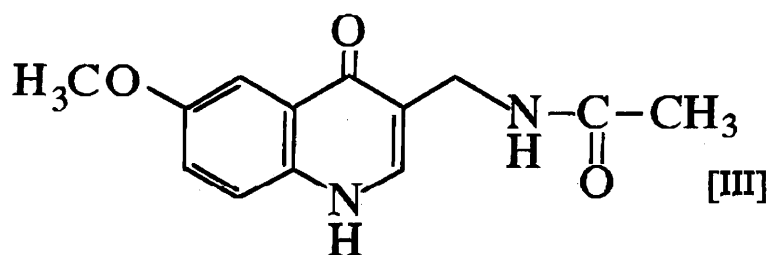
20

【0018】

この発明は、その特に好ましい態様として、該キノリンオキシド誘導体が式 [III] :

【0019】

【化12】



30

で表されるキノリンオキシド誘導体を提供する。

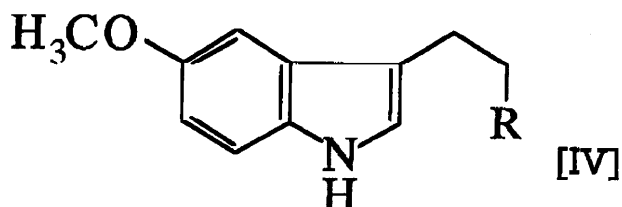
【0020】

更に、この発明は、別の形態として、一般式 [IV] :

40

【0021】

【化13】



50

(式中、Rはアミノ基、アルキルアミド基、カルボキシル基、カルボキシレート基、チオール基またはジスルフィド結合を意味する。)

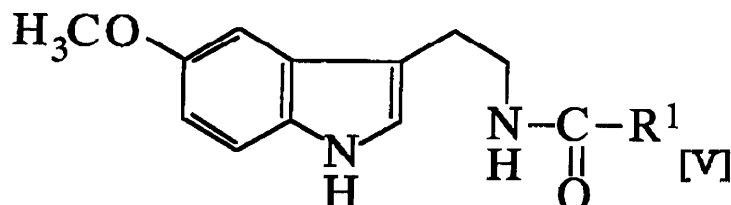
で表されるインドール誘導体を酸化して、上記一般式 [I] で表されるキノリンオキシド誘導体を得ることからなるキノリンオキシド誘導体の製造方法を提供する。

【0022】

この発明の形態における好ましい態様としては、一般式 [V] :

【0023】

【化14】



10

(式中、R¹ はアルキル基を意味する。)

で表されるインドール誘導体を酸化して上記一般式 [II] で表されるキノリンオキシド誘導体を得ることからなるキノリンオキシド誘導体の製造方法を提供する。

【0024】

この発明に係るキノリンオキシド誘導体の製造方法において、その好ましい態様としては、該インドール誘導体をアルカリ性条件下において酸化することからなるキノリンオキシド誘導体の製造方法を提供する。また、この発明は、別の好ましい態様として、上記酸化反応によって得られた該キノリンオキシド誘導体を有機溶媒で抽出することからなるキノリンオキシド誘導体の製造方法を提供する。

20

【0025】

この発明は、その特に好ましい態様として、式 [VI] で表されるメラトニンを酸化して、一般式 [III] で表されるメラトニンオキシドを得ることからなるキノリンオキシド誘導体の製造方法を提供する。

【0026】

この発明は、その更に別の形態として、上記キノリンオキシド誘導体の蛍光強度を測定してメラトニンなどのインドール誘導体の量を測定することからなるキノリンオキシド誘導体の分析方法を提供する。この発明は、その形態の好ましい態様として、内標準物質を加えることからなるキノリンオキシド誘導体の分析方法を提供する。

30

【0027】

また、この発明は、その更に別の形態として、上記インドール誘導体を酸化して、上記キノリンオキシド誘導体を得る酸化部と、該キノリンオキシド誘導体の蛍光強度を測定してキノリンオキシド誘導体の量を求める測定部とを備えているキノリンオキシド誘導体の分析装置を提供する。この発明は、その好ましい態様として、上記酸化部で得られた反応生成物から該キノリンオキシド誘導体を有機溶媒で抽出し、抽出した該キノリンオキシド誘導体を上記測定部に供給する抽出部を備えているキノリンオキシド誘導体の分析装置を提供する。また、別の好ましい態様として、この発明は、内標準物質を加える添加部を更に備えているキノリンオキシド誘導体の分析装置を提供する。更に、この発明は、その別の好ましい態様として、上記測定部がヒーター及び高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とを備えているキノリンオキシド誘導体の分析装置を提供する。

40

【0028】

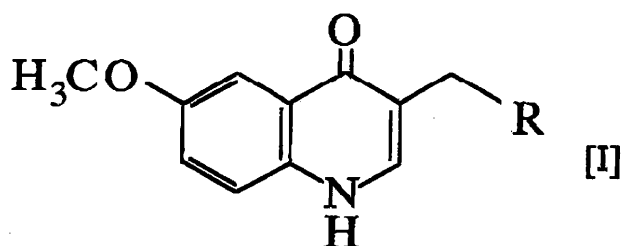
【発明の実施の形態】

この発明に係るキノリンオキシド誘導体は、一般式 [I] :

【0029】

【化15】

50



(式中、Rはアミノ基、アルキルアミド基、カルボキシ基、カルボキシレート基、チオール基またはカルボキシレート基を意味する。)

10

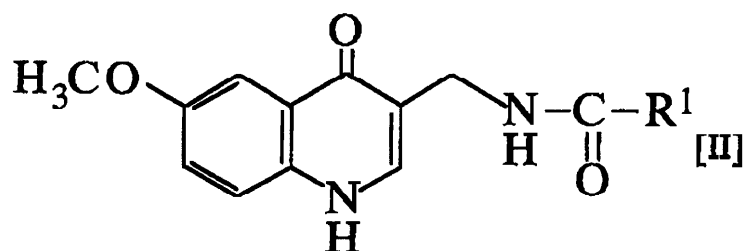
で表される。

【0030】

上記キノリンオキシド誘導体のうち好ましいキノリンオキシド誘導体としては、一般式 [II] :

【0031】

【化16】



20

(式中、R¹はアルキル基を意味する。)

で表されるキノリンオキシド誘導体が挙げられる。

【0032】

また、上記キノリンオキシド誘導体のうち、より好ましいキノリンオキシド誘導体としては、一般式 [I] または一般式 [II] におけるアルキル基が、炭素原子数が1ないし6の、直鎖状もしくは分岐鎖状の1価飽和脂肪族炭化水素残基を意味するキノリンオキシド誘導体が挙げられる。更に、より好ましい態様として、上記アルキル基が、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、i-プロピル基、ブチル基、i-ブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ヘキシル基などを意味するキノリンオキシド誘導体が挙げられる。

30

更に、一般式 [I] で表されるカルボキシレート基としては、例えば、脂肪酸の残基、例えば、酢酸、プロピオン酸などの残基が挙げられる。また、Rがカルボキシレート基を意味する場合には、一般式 [I] で表されるキノリンオキシド誘導体がS-S結合で互いに結合していることを意味している。

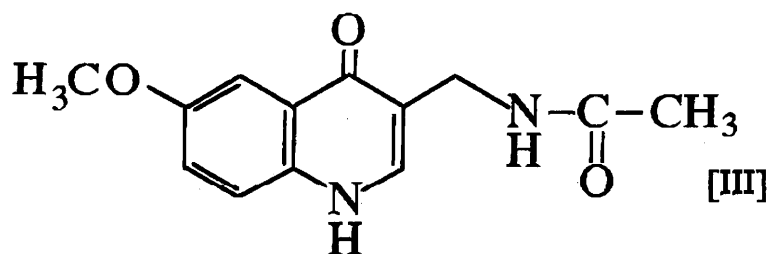
【0033】

この発明に係るキノリンオキシド誘導体のうち、その特に好ましいものとしては、式 [II I] :

40

【0034】

【化17】



で表されるキノリンオキシドが挙げられる。

【0035】

この発明に係るキノリンオキシド誘導体は、強い蛍光を有すると共に、光や熱に対しても安定であることから、優れた蛍光母核となることができる。

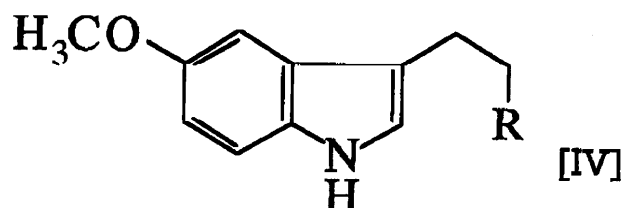
【0036】

この発明において、上記一般式 [I] で示されるキノリンオキシド誘導体は、一般式 [IV]

】：

【0037】

【化18】



(式中、Rはアミノ基、アルキルアミド基、カルボキシル基、カルボキシレート基、チオール基またはジスルフィド結合を意味する。)

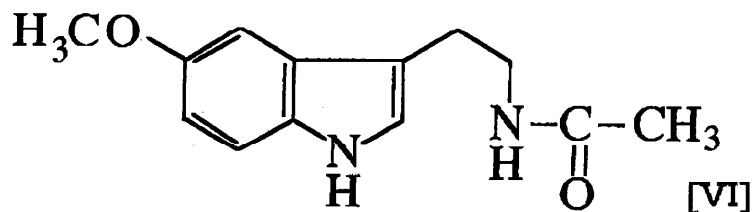
で表されるインドール誘導体を酸化して得ることができる。

【0038】

この発明において、この形態の特に好ましい態様は、式 [VI]：

【0039】

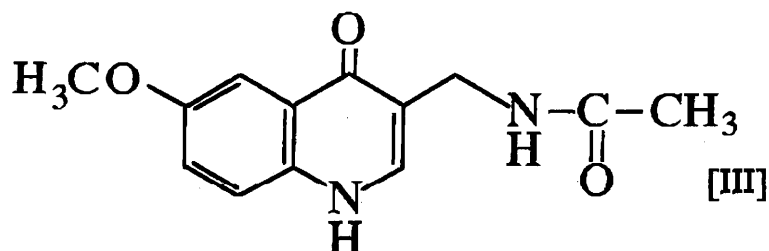
【化19】



で表されるメラトニンを酸化して、式 [III]：

【0040】

【化20】



10

20

30

40

50

で表されるキノリンオキシドを製造するキノリンオキシド誘導体の製造方法である。

【0041】

この発明における酸化反応は、酸化剤を使用して常法に従って行うことができる。使用する酸化剤としては、一般式 [VI] もしくは [V] または式 [IV] で表されるインドール骨格の3位の置換基を酸化することができる酸化剤であればいずれでも使用することができるが、特に好ましい酸化剤としては過酸化水素が挙げられる。また、この発明における酸化反応は、水または炭酸ナトリウムなどの無機溶媒中において、好ましくはアルカリ性下において、例えばpH10~12の条件下で、加熱下で行うのが好ましい。しかしながら、この発明は、これらに何ら限定されるものではなく、この発明の目的に適うのであれば適宜条件は変更することができる。

10

【0042】

上記のようにして、一般式 [IV] および一般式 [V] で表されるインドール誘導体、特に好ましくは式 [VI] で表されるメラトニンを酸化して得られた式 [I] および [II] で表されるキノリンオキシド誘導体、特に好ましくは式 [III] で表されるキノリンオキシド誘導体は、必要に応じて、例えば、メタノール、エタノール、アセトニトリルなどの有機溶媒で抽出することができる。

【0043】

この発明に係るキノリンオキシド誘導体の分析方法は、上記反応式において、一般式 [I]、[II] および [III] で表されるキノリンオキシド誘導体の蛍光強度を測定してキノリンオキシド誘導体の量を求めることによって行うことができる。なお、分析方法自体は、

20

当該技術分野において慣用されている方法を用いて行うことができる。なお、上記したように、キノリンオキシド誘導体を有機溶媒で抽出した場合には、これによりキノリンオキシド誘導体の定量における再現性が低下するおそれがある。

しかし、この場合には、内標準物質を加えて分析するのが好ましい。なお、ここで内標準物質としては、例えば、インドール誘導体と同様にインドール骨格を持ち、酸化によって蛍光誘導体化されてクロマトグラム上で良好なピークを与える物質、例えば5-メトキシインドール-3-酢酸 (MIAA) などを使用することができる。

【0044】

更に、この発明に係るキノリンオキシド誘導体の分析装置は、基本的には、上記酸化反応を行って上記キノリンオキシド誘導体を得る酸化部と、得られたキノリンオキシド誘導体の蛍光強度を測定してキノリンオキシド誘導体の量を求めるキノリンオキシド誘導体測定部とを備えている。

30

なお、上記測定部には、例えば、マイクロHPLC (高速液体クロマトグラフィー) を使用し、高感度化して分析することが好ましい。

【0045】

【実施例】

以下、この発明を実施例によって、更に詳細に説明する。

実施例1：メラトニンオキサイド (MEL oxide: N-[(6-メトキシ-4-オキソ-1, 4-ジヒドロキノリン-3-イル)メチル]アセタミド) の合成法

メラトニン (MEL) 150mg (610 μ mol) のメタノール溶液 (600 μ l) を 100mM炭酸ナトリウム水溶液 15ml に溶解し、この混合液を80℃で加熱下攪拌しながら、3M過酸化水素水 400 μ l を10分ごとに15時間滴下した。反応終了後、固相カートリッジを用いて抽出をして、得られたメタノール溶液を減圧留去し、残査を水から再結晶して無色の針状結晶を得た (40.12mg、163 μ mol、収率25.2%)。

40

得られたメラトニンオキサイドの機器分析結果は下表1に示す。更に、その¹H-NMRと¹³C-NMRとをそれぞれ図1及び図2に示す。

【0046】

実施例2：エチルオキシド (N-[(6-メトキシ-4-オキソ-1, 4-ジヒドロキノリン-3-イル)メチル]プロピオンアミド) の合成法

50

メラトニンエチルアナログ 150 mg のメタノール溶液 (600 μ l) を 100 mM 炭酸ナトリウム水溶液 15 ml に溶解し、この混合液を 80 $^{\circ}$ C で加熱下攪拌しながら、3 M 過酸化水素水 400 μ l を 10 分ごとに 15 時間滴下した。反応終了後、固相カートリッジを用いて抽出をして、得られたメタノール溶液を減圧留去し、残査を水から再結晶して結晶を得た (40.66 mg、156 μ mol、収率 25.6%)。得られた化合物の機器分析結果は下表 1 に示す。

【0047】

実施例 3： プロピルオキシド (N-[(6-メトキシ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-イル)メチル]ブタンアミド) の合成法

メラトニンプロピルアナログ 150 mg を実施例 2 と同様に反応させ、メタノールから再結晶してプロピルオキシドを結晶として得た (35.59 mg、130 μ mol、収率 22.5%)。得られた化合物の機器分析結果は下表 1 に示す。

【0048】

実施例 4： イソプロピルオキシド (N-[(6-メトキシ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-イル)メチル]イソブタンアミド) の合成法

メラトニンイソプロピルアナログ 150 mg を実施例 2 と同様に 18 時間反応させ、メタノールから再結晶してイソプロピルオキシドを結晶として得た (51.99 mg、189 μ mol、収率 32.9%)。得られた化合物の機器分析結果は下表 1 に示す。

【0049】

実施例 5： tert-ブチルオキシド (N-[(6-メトキシ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-イル)メチル]tert-ブチルカルボンタンアミド) の合成法

メラトニンイソプロピルアナログ 150 mg を実施例 4 と同様に反応させ、メタノールから再結晶して tert-ブチルオキシドを結晶として得た (58.58 mg、203 μ mol、収率 37.2%)。得られた化合物の機器分析結果は下表 1 に示す。

【0050】

【表 1】

Compound	MW	MS M+H	Elementary Analysis		$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6)	
			calcd.	found		
MEL oxide	246.3	247.2	C; 63.41 H; 5.69 N; 11.38	C; 63.17 H; 5.68 N; 11.30	δ 1.82 (3H, s, -COCH ₃) 3.82 (3H, s, -OCH ₃) 4.08 (2H, d, -CH ₂ -)	7.26-7.79 (4H, m, ArH) 8.00 (1H, t, -NH-) 11.7 (1H, s, -NHCO-)
ethyl oxide	260.3	261.2	C; 64.62 H; 6.15 N; 10.77	C; 64.41 H; 6.20 N; 10.70	δ 0.99 (3H, t, -CH ₃) 2.10 (2H, q, -COCH ₂ -) 3.82 (3H, s, -OCH ₃) 4.10 (2H, d, -CH ₂ -)	7.26-7.77 (4H, m, ArH) 7.92 (1H, t, -NH-) 11.7 (1H, s, -NHCO-)
n-propyl oxide	274.3	275.3	C; 65.69 H; 6.57 N; 10.22	C; 65.48 H; 6.60 N; 10.12	δ 0.84 (3H, t, -CH ₃) 1.51 (2H, m, -CH ₂ -) 2.07 (2H, t, -COCH ₂ -) 3.82 (3H, s, -OCH ₃)	4.10 (2H, d, -CH ₂ -) 7.26-7.76 (4H, m, ArH) 7.95 (1H, t, -NH-) 11.7 (1H, s, -NHCO-)
isopropyl oxide	274.3	275.2	C; 65.69 H; 6.57 N; 10.22	C; 65.41 H; 6.49 N; 10.13	δ 1.00 (6H, d, -CH ₃) 2.40 (1H, sept, -CH-) 3.82 (3H, s, -OCH ₃) 4.10 (2H, d, -CH ₂ -)	7.26-7.73 (4H, m, ArH) 7.91 (1H, t, -NH-) 11.7 (1H, s, -NHCO-)
tert-butyl oxide	288.3	289.3	C; 66.67 H; 6.94 N; 9.72	C; 66.50 H; 6.98 N; 9.65	δ 1.11 (9H, s, -CH ₃) 3.83 (3H, s, -OCH ₃) 4.13 (2H, d, -CH ₂ -)	7.26-7.66 (4H, m, ArH) 7.74 (1H, t, -NH-) 11.7 (1H, s, -NHCO-)

【0051】

実施例 6

5-メトキシトリプタミンに 2 M 炭酸ナトリウムと 100 mM 過酸化水素水溶液を加え、100 $^{\circ}$ C で 30 分間加熱してアミン体 ([I] : R = アミノ) を得た。この時の蛍光強度を測定した結果、励起極大波長 245 nm、蛍光極大波長 380 nm の強い蛍光が認められ

た。

【0052】

実験例1：メラトニンオキシドのX線回折解析

実施例1で得た化合物のX線回折分析のために、上記化合物を緩和な条件下でメタノール水溶液（水／メタノール＝10：1（v/v））から再結晶した。

X線回折解析の結果、この化合物が、メラトニンオキサイド（N-[(6-メトキシ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキノリン-3-イル)メチル]アセタミド）であることを確認した（図3）。また、X線回折解析によって得られたメラトニンオキサイドの結晶についての分析結果を表2に示す。

【0053】

10

【表2】

empirical formula	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃
formula weight	246.27
color	colorless
habit	needle
space group	Cc
unit cell dimensions	a = 22.084(6) Å b = 4.841(1) Å, β = 119.82(1)° c = 13.174(3) Å
volume	1221.8(5) Å ³
Z	4
density (calculated)	1.339 g/cm ³
absorption coefficient	0.96 cm ⁻¹
wavelength	0.71075 Å
temperature	120 K
diffractometer	Rigaku RAXIS-RAPID
reflections measured	5700
independent reflections	1379
parameters	177
R ₁	0.049
wR ₂	0.039
GOF	2.47

20

30

【0054】

実験例2：メラトニンオキサイドおよびそのアナログオキシドの蛍光性

メラトニンオキサイドおよびそのアナログオキシドについて、10%メタノール水溶液を溶媒として10 μMにおける励起・蛍光スペクトルを測定した。また、UVスペクトルを測定し、吸収極大波長245 nmにおけるモル吸光係数を算出した。結果を下表3に示す。

40

【0055】

【表3】

Compound	Ex. (nm)	Em. (nm)	FI	ϵ (245nm)
melatonin oxide	245	378	2277	46600
ethyl oxide	245	378	2320	46700
n-propyl oxide	245	377	2300	46200
isopropyl oxide	245	376	2323	45700
tert-butyl oxide	245	376	2379	47700

FI ; Fluorescence intensity. The fluorescence intensities of these compounds are measured using 10 μ M solutions.
solvent ; MeOH / H₂O = 1 / 9 (v / v)

10

【 0 0 5 6 】

実験例 3 : メラトニンオキシドの蛍光特性

逆相 H P L C によるメラトニンの感受性を決定するために、各種有機溶媒中におけるメラトニンオキシドの極大蛍光励起・発光波長と相対蛍光強度 (Relative Fluorescence Intensity: RFI) についてメラトニンオキシドの蛍光特性を調べた。有機溶媒としては、逆相 H P L C に幅広く使用されているメタノール、エタノール、アセトニトリルを使用した。その結果を表 4 に示す。この結果から、試験した有機溶媒においては、蛍光強度は溶媒濃度が高くなるにつれて弱くなるのに対し、極大蛍光励起・発光波長は変化しないことが判明した。

20

【 0 0 5 7 】

【表 4】

Content	RFI		
(%)	CH ₃ OH	CH ₃ CH ₂ OH	CH ₃ CN
0	100	100	100
10	93.6	91.6	99.0
20	81.3	82.9	88.0
50	71.6	49.5	47.3
100	27.6	25.7	3.0

30

RFI: Relative fluorescence intensities (Ex. 245 nm, Em. 380 nm)

The value obtained using H₂O as the solvent is taken as 100.

40

【 0 0 5 8 】

実験例 4 : マウス松果体試料の調製

マウスをエチルエーテルで麻酔をした後、全松果体を摘出し、60 p M の M I A A を含むメタノール溶液 500 μ l に入れて、氷上で 1000 r p m で 20 分間ホモジナイズした。得られたホモジネートを 4500 x g で 5 分間遠心分離をして、上澄液 400 μ l を乾

50

燥した。残査に水40 μ lと、4M炭酸ナトリウム水溶液2.5 μ lと、250mM過酸化水素水とを添加して、100℃で30分間加熱した。処理した反応液から得られたメラトニンオキシドを酢酸エチル150 μ lで3回抽出して、細胞中の親水性の生物物質からメラトニンオキシドを分離した。得られた有機相を乾燥して、残査に5%アセトニトリル水溶液30 μ lを添加し、得られた溶液5 μ lをHPLCシステムに注入した。得られた結果を図4および図5に示す。

検量線は次ぎのようにして作成した。15匹のICRマウスから、全松果体を摘出し、60pMのMIAAを含むメタノール溶液7.5mlに入れて一緒にホモジナイズし、得られたホモジネートを遠心分離した。得られた上澄液400 μ lに、0.04nM、0.2nM、1nM、10nMのメラトニンのメタノール溶液30 μ lをそれぞれ添加した後乾燥した。得られた残査を誘導化して、上記のようにして分析した。

10

【0059】

上記したように、メラトニンの酸化混合物の蛍光性は、メラトニンとは異なっていて、この特性はメラトニンを高感度で特定することが可能である。この発明に係るメラトニンオキシドは、炭酸ナトリウムなどを使用したアルカリ性条件下で、メラトニンに過酸化水素を断続的に添加して、その構造を特定した。酸化反応が進行するにつれて、蛍光・励起波長(380nm、245nm)での蛍光強度は高くなるのに対して、メラトニン自体の蛍光・励起波長(330nm、280nm)での蛍光強度は低くなる。このメラトニンオキシドを精製した後、無色の結晶が得られた。この結晶は、245nmの最大吸収波長を有していて、メラトニンの反応混合物の蛍光励起スペクトルと発光スペクトルと同じスペクトルを有している(図6)。更に、この化合物は、固相HPLCにおいてメラトニンの分析物と保持時間が同じである。

20

【0060】

上記したように、この発明に係るメラトニンオキシドならびにメラトニンのアナログオキシド、例えば、エチルアナログ、n-プロピルアナログ、イソプロピルアナログ、tert-ブチルアナログなどは、メラトニンの微量分析に有用である。また、この発明に係るキノリンオキシド誘導体の分析方法も、その分析装置もメラトニンの微量分析に有効に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】メラトニン酸化物の¹H-NMRスペクトルを示す図。

30

【図2】メラトニン酸化物の¹³C-NMRスペクトルを示す図。

【図3】X線回折解析に基づくメラトニン酸化物の分子構造を示す図。

【図4】5-メトキシインドール-3-酢酸(MIAA)を添加していない場合における内因性マウス松果体のメラトニン誘導体のクロマトグラムを示す図。図中、(A、B)はICRマウス松果体の内生メラトニンを調製して分析をした場合を示し、(C)はメラトニン誘導体とMIAAとの標準混合物を分析した場合を示している。

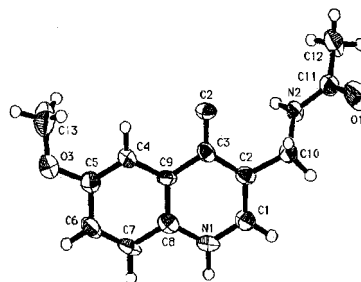
【図5】内標準物質としてMIAAを使用した場合における異なるマウスの松果体のメラトニン誘導体のクロマトグラムを示す図。

【図6】メラトニンの反応液と、メラトニン酸化物の励起・蛍光スペクトルを示すグラフ。(A)は、メラトニンを炭酸ナトリウムの存在下で過酸化水素で100℃で30分間酸化した場合の励起・蛍光スペクトルを示し、(B)メラトニン酸化物を10%メタノール水溶液に溶解した場合の励起・蛍光スペクトルを示している。

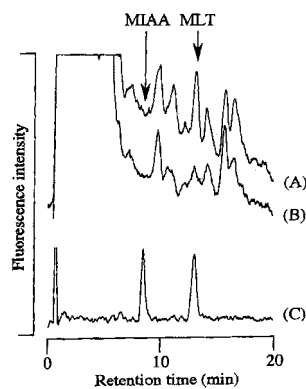
40

【図7】メラトニン誘導体(A)と、得られたメラトニン酸化物(B)のクロマトグラムを示すグラフ。

【 図 3 】



【图 4】



【图 7】

