

—一般論文—

Melatonin の trifluoroacetyl 誘導体の生成機構に関する考察

恋田和憲^{a)}、今村 仁^{a)}、森本宏治^{a)}、橋本圭二^{b)}、
河合 聡^{a)*}、宇野文二^{a)}

要約：Melatonin およびその関連化合物の trifluoroacetyl (TFA) 化反応によって生成する 3,3-spirocyclic インドール誘導体の生成機構を考察した。Melatonin、melatonin-(*N*-acetyl)-*d*₃、serotonin 類および tryptamine 類の TFA 誘導体のマススペクトルの測定とその解析より、この特異的な誘導体化反応は側鎖にエノール化する *N*-acyl 基をもつ *N*-acyltryptamine 類に共通して起こる閉環反応であることを明らかにした。そして、インドール骨格の *N*-TFA 化による 3 位の活性化と側鎖の *N*-acyl 基のエノール化を経て spirocyclic 構造生成に至る melatonin の TFA 誘導体反応の生成機構が提唱された。

索引用語：melatonin、*N*-acyltryptamine 類、trifluoroacetyl 化、3,3-spirocyclic インドール誘導体、ガスクロマトグラフィ、質量分析

Mechanistic Study on Generation of the Trifluoroacetyl
Derivative of MelatoninKazunori KOIDA,^{a)} Hitoshi IMAMURA,^{a)} Kouji MORIMOTO,^{a)} Keiji HASHIMOTO,^{b)}
Satoshi KAWAI,^{a)*} and Bunji UNO^{a)}

Abstract: The trifluoroacetylation (TFA) mechanism of melatonin was extensively discussed on the basis of mass spectral data for the TFA derivatives of melatonin, melatonin-(*N*-acetyl)-*d*₃, serotonin, and tryptamines. It has been demonstrated that 3,3-spirocyclic indole derivatives are commonly generated in the TFA reactions of *N*-acyltryptamines of the enolic form. We have proposed a mechanism where the specific cyclization reaction involving the spirocyclic structure proceeds by virtue of activation of the 3-position of the indole moiety induced by TFA of the N atom in the moiety and enolation of the *N*-acyl group.

Keyphrases: melatonin, *N*-acyltryptamines, trifluoroacetylation, 3,3-spirocyclic indole derivative, gas chromatography, mass spectrometry

緒言

Melatonin (**1**) は Fig. 1 に示す化学構造を有し、serotonin (**3**) より合成され哺乳動物の松果体の中に存在する¹⁾。そして、性の早熟を抑制する作用や生体の日周リズムを調節する作用などが知られている²⁾。しかし、**1** の生理作用のさらなる解明には、**1** の微量分析法の開発が強く望まれている。著者らはこれに寄与する目的で、trifluoroacetic

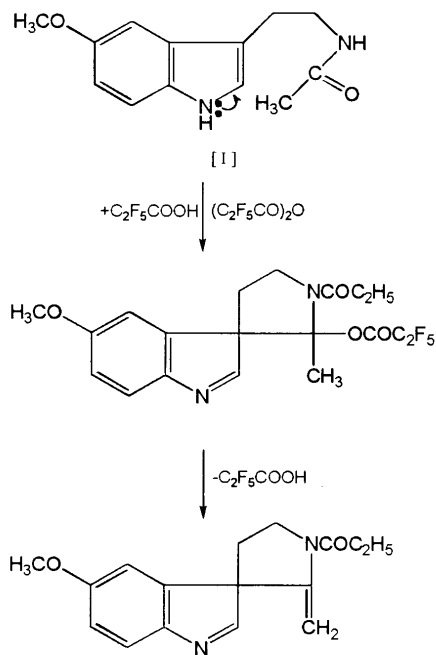
anhydride (TFAA) による trifluoroacetyl (TFA) 誘導体化を利用した **1** の ECD-GC による超微量分析法の開発に取り組んできた³⁾。その過程で、**1** の TFA 誘導体は 3,3-spirocyclic 構造を含むことを明らかにした³⁾。同時期、Blau らは **1** の pentafluoropropionyl (PFP) 化反応について NMR スペクトルの測定とその詳細な解析によって、**1** の PFP 体は TFA 体と同様に 3,3-spirocyclic 体であることを明らかにした⁴⁾。Blau らによって提唱された生成機構を

a) 岐阜薬科大学薬品分析化学教室 (〒502-8585 岐阜市三田洞東 5 丁目 6-1)

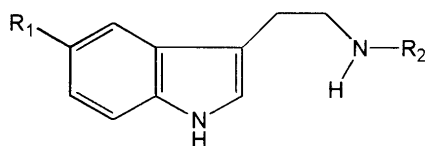
Laboratory of Pharmaceutical Analytical Chemistry, Gifu Pharmaceutical University
(5-6-1, Mitahora-higashi, Gifu 502-8585, JAPAN)

b) 京都薬科大学構造有機化学教室 (〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5)

Kyoto Pharmaceutical University, (Misasagi-Nakauchicho, Yamashinaku, Kyoto 607-8414, JAPAN)



Scheme 1. Mechanism for the formation of the PFP derivative of **1**, proposed by Blau et al.



- 1 $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{COCH}_3$ (melatonin)
- 2 $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{COCD}_3$ (melatonin-(*N*-acetyl)- d_3)
- 3 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$ (serotonin)
- 4 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{COCH}_3$
- 5 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$ (tryptamine)
- 6 $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{H}$
- 7 $R_1 = \text{OCOCH}_3$, $R_2 = \text{COCH}_3$
- 8 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{COCH}_3$
- 9 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{COCD}_3$
- 10 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{COCH}_2\text{CH}_3$
- 11 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$

Fig. 1. Structures of the tryptamine related compounds used here.

Scheme 1 に示した。著者らは、**1** の関連化合物だけでなく、Fig. 1 に示す **3** の関連化合物である *N*-acetylserotonin (**4**) や tryptamine (**5**) の関連化合物である 5-methoxytryptamine (**6**)、*N*-acetyl-5-acetoxytryptamine (**7**)、*N*-acetyltryptamine (**8**)、*N*-propionyltryptamine (**10**)、*N*-*n*-butyltryptamine (**11**) など多くの化合物の TFA 誘導体化や heptafluorobutyl (HFB) 誘導体化における spirocyclic 体生成の可否について検討し、その反応の鍵となる点についてさらに考察して生成機構を提唱した。

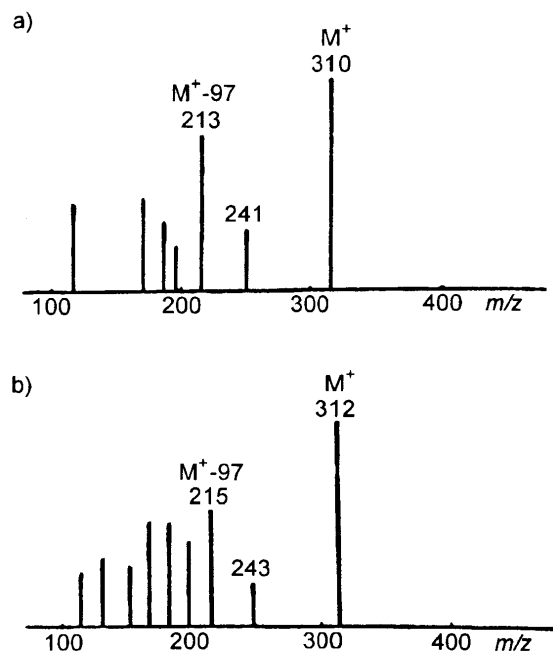


Fig. 2. Mass spectra of the TFA derivative (**12**) of melatonin (**1**) (a) and the TFA derivative (**13**) of melatonin-(*N*-acetyl)- d_3 (**2**) (b).

実験

装置：高分解能マススペクトロメーターは AEI-MS-50 型を使用し、イオン加速電圧 1800 V、電子ビームのエネルギーは 70 eV、イオン源温度 200°C でイオン化し、増幅電圧は 2 kV を測定条件とした。

ガスクロマトグラフ測定は、長さ 1.5 m、内径 4 mm の 2%GE-XF1105 カラムを用い、180°C で行った。

試薬および化合物：誘導体化試薬として用いた、TFAA、acetic anhydride (AA)、heptafluorobutyric anhydride (HFBA) は和光純薬から購入し、acetic anhydride- d_6 (AA- d_6) はメルク社から購入した。本研究で用いた tryptamine 関連化合物を Fig. 1 に示した。**1** は半井テスク社、**3** および **5** は和光純薬から特級品を購入し、そのまま用いた。

Fig. 1 に示した化合物はそれぞれ **1**、**3**、**5** を出発原料とし、定法により methyl 化および AA または AA- d_6 を用いて acetyl 化することにより得た。そして、これらはいずれも元素分析により同定した。また、対照として用いた acetylbenzylamine および acetylbenzylamine-(acetyl)- d_3 は、benzylamine にそれぞれ AA および AA- d_6 を作用させて得た。いずれも元素分析により同定した。

誘導体化反応：試料の酢酸エチル溶液 1.0 mL を蒸発乾固したのち、酢酸エチル 2 滴、TFAA または HFBA 0.1 mL を加え 10 分間放置後、その一定量を GC-MS によって測定した。

結果と考察

N-acyltryptamine 関連化合物の Spirocyclic 体の生成

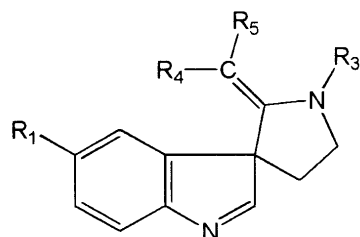
Blau らはマスペクトルおよび NMR スペクトルの測定結果とその詳細な解析によって **1** の PFP 誘導体は 3,3-spirocyclic 構造を有することを明らかにしている⁴⁾。Fig. 2 に **1** およびその側鎖の acetyl 基の H 原子を重水素化した melatonin-(*N*-acetyl)-*d*₃ (**2**) の TFA 誘導体のマスペクトルを示した。**1** の TFA 誘導体のスペクトルには、期待されるような、N 原子が TFA 化された $M^+ = 424$ (二置換体) も $M^+ = 328$ (一置換体) の分子ピークも観測されず、 $M^+ = 310$ の分子ピークと COCF₃ 基 1 つの脱離を伴うフラグメントピーク ($M^+ - 97$) が観測されている。また、**2** の TFA 誘導体のマスペクトルには **1** の TFA 誘導体のそれよりも 2 マスユニット大きな分子ピークと ($M^+ - 97$) のフラグメントピークが観測されていることがわかる。これらの結果は、**1** や **2** の TFA 誘導体が Blau らの PFP 誘導体と同様に 3,3-spirocyclic 閉環反応を含む TFA の 1 置換体であることを示し、Fig. 3 の **12** や **13** の構造であることが明らかとなった。

Table 1 に類縁体である serotonin 類 (**3**, **4**) や tryptamine 類 (**5**-**11**) の TFA および HFB 誘導体について測定したマスペクトルデータを示した。これら化合物の誘導体は、それぞれ対応する spirocyclic 構造に相当する分子イオンピークを有し、さらに TFA 基 (質量数 97) または HFB 基 (質量数 197) の脱離を伴うフラグメントイオン (Table

1 の下線数値) を示している。また、**1** と **2** の TFA 誘導体 (**12** と **13**) の比較でみられたと同様に、*N*-acetyltryptamine (**8**) の TFA 誘導体とその重水素化物 *N*-acetyltryptamine-(*N*-acetyl)-*d*₃ (**9**) の TFA 誘導体の間にも対応するシグナルに質量数 2 の開きが観測されている。したがって、これらの誘導体は Fig. 3 の **17** および **18** の構造であることが理解できる。また、*N*-propionyltryptamine (**10**) と *N*-*n*-butyryltryptamine (**11**) の TFA 誘導体も同様に、それぞれ $M^+ = 294$ と $M^+ = 308$ の分子ピークと TFA 基 1 つの脱離を伴うフラグメントピーク ($M^+ - 97 = 197$) と ($M^+ - 97 = 211$) を観測し spirocyclic 構造をとることが明らかであるが、これらの誘導体には Fig. 4 の R₄, R₅ に関するシス・トランス異性体が存在する。事実、**20** (**10** の TFA 誘導体) のガスクロマトグラム上には 2 つのピークが観測され、それぞれのマスペクトルは完全に一致していた。この実験結果は、**10** や **11** の TFA 誘導体はその構造中に C=CH₂ 構造を含む **20** や **21** であることを決定的に裏付けている。以上の結果、すべての *N*-acyl 基を有する tryptamine 関連化合物の TFA 化、PFP 化 (Blau らの報告) および HFB 化反応に共通のきわめて特異的な閉環反応であることが明らかとなった。

Spirocyclic 体の生成機構

Fig. 2 の 2 つのマスペクトルの比較より、**1** および **2** の TFA 誘導体生成においては、いずれも OH 基、OD 基の



- 12** R₁ = OCH₃, R₃ = COCF₃, R₄ = R₅ = H
- 13** R₁ = OCH₃, R₃ = COCF₃, R₄ = R₅ = D
- 14** R₁ = OCH₃, R₃ = COCF₂CF₂CF₃, R₄ = R₅ = H
- 15** R₁ = OCOCF₃, R₃ = COCF₃, R₄ = R₅ = H
- 16** R₁ = OCOCH₃, R₃ = COCF₃, R₄ = R₅ = H
- 17** R₁ = H, R₃ = COCF₃, R₄ = R₅ = H
- 18** R₁ = H, R₃ = COCF₃, R₄ = R₅ = D
- 19** R₁ = H, R₃ = COCF₂CF₂CF₃, R₄ = R₅ = H
- 20** R₁ = H, R₃ = COCF₃, R₄ (R₅) = CH₃, R₅ (R₄) = H
- 21** R₁ = H, R₃ = COCF₃, R₄ (R₅) = CH₂CH₃, R₅ (R₄) = H

Fig. 3. Structures of 3,3-spirocyclic indole compounds derived from *N*-acyltryptamines.

Table 1. Main Mass Spectral Data for the Derivatization Products of *N*-acyltryptamines¹⁾

Compounds ²⁾	<i>m/z</i> (% of base peak)
TFA-derivative (12) of 1 ³⁾	310 (100; [M] ⁺), <u>213</u> (70)
TFA-derivative (13) of 2 ⁴⁾	312 (100; [M] ⁺), 243 (20), <u>215</u> (56)
HFB-derivative (14) of 1	410 (100; [M] ⁺), 241 (20), <u>213</u> (40)
TFA-derivative (15) of 4	392 (100; [M] ⁺), <u>295</u> (60)
TFA-derivative (16) of 7	338 (24; [M] ⁺), 296 (100), <u>199</u> (48)
TFA-derivative (17) of 8	280 (100; [M] ⁺), 211 (32), <u>183</u> (66)
TFA-derivative (18) of 9	282 (100; [M] ⁺), 213 (20), <u>185</u> (68)
HFB-derivative (19) of 8	380 (100; [M] ⁺), 211 (20), <u>183</u> (64)
TFA-derivative (20) of 10	294 (100; [M] ⁺), 279 (63), <u>197</u> (20)
TFA-derivative (21) of 11	308 (72; [M] ⁺), 279 (100), <u>211</u> (24)

- 1) Samples were introduced via the GC column.
- 2) Abbreviations: TFA = trifluoroacetyl, HFB = heptafluorobutyryl
- 3) The MS spectrum was shown in Fig. 2a.
- 4) The MS spectrum was shown in Fig. 2b.

Table 2. Main Mass Spectral Data for the Derivatization Products of Benzylamines¹⁾

Compounds ²⁾	<i>m/z</i> (% of base peak)
TFA-derivative of <i>N</i> -acetylbenzylamine	245 (19; [M] ⁺), 182 (67), 131 (100), 106 (37)
TFA-derivative of <i>N</i> -deuterioacetylbenzylamine	248 (12; [M] ⁺), 182 (41), 133(65), 106 (100)

1) Samples were introduced via the GC column.

2) Abbreviations: TFA=trifluoroacetyl

Table 3. Main Mass Spectral Data for the Derivatization Products of **5** and **6**¹⁾

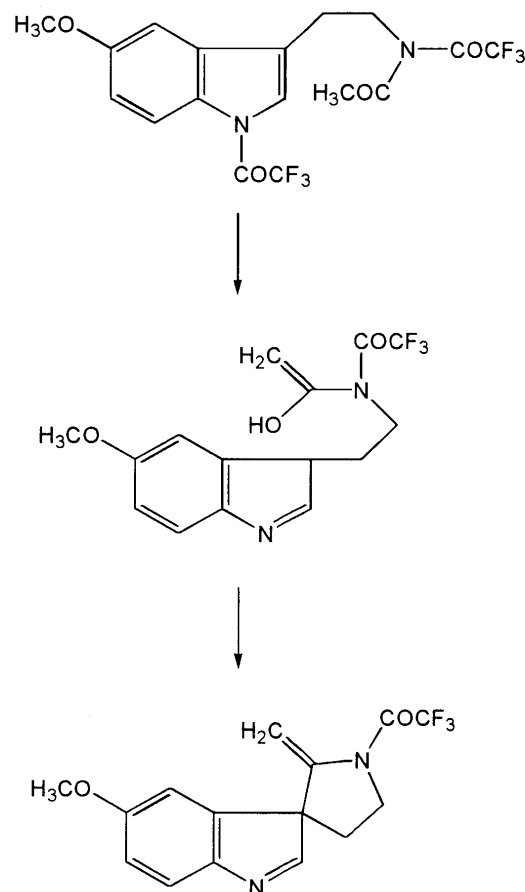
Compounds ²⁾	<i>m/z</i> (% of base peak)
mono-TFA-derivative of 5	256 (23; [M] ⁺), 239 (46), 143 (46), 130 (100)
di-TFA-derivative of 6	382 (24; [M] ⁺), 269 (56), 256 (64), 159 (100)
tri-TFA-derivative of 6	478 (55; [M] ⁺), 381 (32), 284 (100), 267 (55)

1) Samples were introduced via the GC column.

2) Abbreviations: TFA = trifluoroacetyl.

脱離を伴っており側鎖 *N*-acetyl 基のエノール化が深く関わっていることが推察される。このことを明らかにするために、benzylamine 類のマスペクトルを測定した結果を Table 2 に示した。*N*-acetylbenzylamine の TFA 誘導体では *m/z* = 131 のフラグメントイオンは分子イオン M⁺ (*m/z* = 245) より CF₃COOH が脱離して生成したものである。同様に、重水素化した *N*-acetylbenzylamine-(*N*-acetyl)-*d*₃ の TFA 誘導体では、*m/z* = 133 のフラグメントイオンは分子イオン M⁺ (*m/z* = 248) より CF₃COOD が脱離して生成したものである。これらのフラグメントイオンの生成から側鎖 acetyl 基のエノール化が起っていることが裏付けられる。Blau らは、**1** の PFP 誘導体の生成機構として中間体にエノール基の PFP 化 (-OCOCF₂CF₃) の生成を推定している (Scheme 1)。しかし、Table 2 からわかるように、*N*-acetylbenzylamine の TFA 化反応において *O*-TFA 体の生成に対応するシグナル (*m/z* = 341) は観測されず、また *N*-acetylbenzylamine-(*N*-acetyl)-*d*₃ の TFA 化反応においても *O*-TFA 体 (*m/z* = 344) 生成に対応するシグナルも観測されない。これらのことより、Scheme 1 の生成機構を推定するのは困難である。

次に、tryptamine (**5**) の mono-TFA 誘導体、5-methoxytryptamine (**6**) の di-TFA 誘導体と tri-TFA 誘導体のマスペクトル結果を Table 3 に示した。**5** の mono-TFA 誘導体では、*m/z* = 256 に分子ピーク、*m/z* = 143 に McLafferty 転位によるフラグメントイオン、*m/z* = 130 にβ開裂によるフラグメントイオンのピークが観測されている。これらは側鎖の *N*-TFA 体の生成を示している。次に、**6** の di-TFA 誘導体では、*m/z* = 352 に分子ピーク、*m/z* = 239 に McLafferty 転位によるフラグメントイオン、*m/z* = 226 にβ開裂によるフラグメントイオン、*m/z* = 129

Scheme 2. Proposed mechanism for the formation of the TFA derivative of **1**.

にはさらに TFA 基 1 つが脱離したフラグメントイオンのピークが観測される。これらの事実は、TFA 誘導体化において 2 つめの TFA 基はインドール骨格の N 原子に導入されていることを示している。**6** の tri-TFA 誘導体では、*m/z* = 478 に分子ピーク、*m/z* = 381 に 1 つの TFA 基が脱離したフラグメントイオン、さらに *m/z* = 284 に 2 つの TFA 基が脱離したフラグメントイオンのピークが観測されるが、spirocyclic 閉環反応に伴う CF₃COOH の脱離は見られない。このことより、spirocyclic 化の進行には側鎖の *N*-acetyl 基のエノール化が必要であること、さらにインドール骨格の *N*-TFA 基による 3 位の活性化が誘起される必要があることが推測される。Degen らは、**1** の heptafluorobutyrylimidazole (HFBI) による誘導体化反応について研究し⁹⁾、この反応においてもインドール骨格の *N*-HFB 体生成を認めている。しかし、heptafluorobutyric

anhydride による反応とは異なり、HFBI による反応では側鎖の *N*-acetyl 基は容易に HFB 基と交換し acetyl 基を失うため、spirocyclic 閉環反応は進行していない。このことも閉環反応に *N*-acetyl 基のエノール化が重要な鍵反応であることを裏付けている。

以上の考察により、1 の TFA 誘導体化反応において spirocyclic 構造の生成は Scheme 2 に示す機構であると考えることができる。つまり、1 は TFAA により側鎖の *N*-acetyl 化とインドール骨格の *N*-acetyl 化が進行して、インドール骨格の 3 位の活性化と acetyl 基（一般には acyl 基）のエノール化を経て spirocyclic 構造が生成するものと提唱することができる。

結 論

Melatonin の GC-MS を利用した超微量分析法の開発に取り組む過程において、その TFA 誘導体がきわめて特異的な閉環反応を起こすことを見だし、生成した誘導体は spirocyclic 構造であることを明らかにした。この閉環反応は側鎖にエノール化する *N*-acyl 基を有する tryptamine 関連化合物に共通することを明らかにする中で、著者らは側鎖アシル基のエノール化とインドール骨格 *N*-TFA 基による 3 位活性化によって進行する誘導体化機構を提唱した。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、前岐阜薬科大学教授牧敬文博士およびスイス工業大学 Seibl 博士より有益なご助言を頂きました。心から深謝いたします。

引用文献

- 1) H. Wissbach, J. Axelrod, *Biochim. Biophys. Acta*, **43**, 352 (1960); H. Wissbach, J. Axelrod, *J. Biol. Chem.*, **236**, 211 (1961).
- 2) 久田, 代謝, **11**, 1401 (1974); 平田, 代謝, **11**, 1379 (1974); 森本, 代謝, **11**, 1389 (1974).
- 3) 恋田和憲, 岐阜薬科大学修士論文 (1978).
- 4) K. Blau, G. S. King, and M. Sandler, *Biomed. Mass Spectrom.*, **4**, 232 (1977).
- 5) P. H. Degen, J. R. Doamaral, and J. D. Barchas, *Anal. Biochem.*, **45**, 634 (1972).