

새로운 HPLC용 형광유도체 화제인 1-(N,N-dimethylamino)pyrene-6-sulfonyl chloride를 이용한 아민화합물의 분석

이윤중 · 김용희 · 조정길*

성균관대학교 약학대학, *태평양제약 중앙연구소

(Received July 8, 1991)

Determination of Amine Compounds Using 1-(N,N-Dimethylamino)pyrene-6-sulfonyl chloride as a New Fluorescent Derivatizing Reagent for HPLC

Yoon-Joong Lee, Yong-Hee Kim and Jeung-Kil Cho*

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

*Central Research Institute, Pacific Pharmaceutical Company, Seoul 135-080, Korea

Abstract—A new fluorescent derivatizing reagent was developed to be used in HPLC for the trace determination of primary and secondary amines. This new reagent, 1-(N,N-dimethylamino)pyrene-6-sulfonyl chloride, was synthesized by the chlorination of sodium 1-(N,N-dimethylamino)pyrene-6-sulfonate which was obtained from 1-(N,N-dimethylamino)pyrene after sulfonation. Ephedrine and norephedrine were derivatized quantitatively by this reagent. The optimum conditions for the derivatization such as pH, reagent concentration, reaction time and reaction temperature were examined. The structures of derivatives were identified by IR, ¹H-NMR and MS methods. The fluorescence properties and the stability of the derivatives were examined. The derivatives were separated on silica column with an isocratic elution using the mixture of n-hexane and ethylacetate and monitored by fluorescence detector. Linear calibration curves were obtained and detection limits in a 10 μl injection volume were 5 picomole for ephedrine and norephedrine.

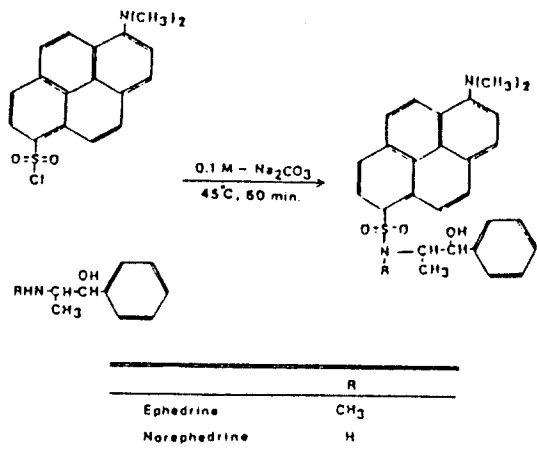
Keywords □ 1-(N,N-dimethyl amino)pyrene-6-sulfonyl chloride, new fluorescent derivatizing reagent, HPLC analysis of amines.

조직추출물 및 생체액 중에서 아민기를 가진 생리 활성물질의 분석은 생화학 및 약학분야에서 매우 중요하다. 그러나 유리상태의 아민은 매우 극성이 큰 물질이어서 기존의 분석법으로는 분리가 제한되고, 정량적인 분석이 쉽지 않았다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 유리상태의 아민을 분리가 양호하도록 유도체화한 후 HPLC에 의해 분리 정량하는 방법이 많이 이용되고 있다.¹⁻⁷⁾

Pyrene은 형광성이 뛰어난 물질로서⁸⁾ 이를 모핵으로한 형광유도체화제로는 carboxyl기와 반응하여 ester를 생성할 수 있는 BAP⁹⁾ 및 PDAM¹⁰⁾과 sulfhydryl기와 반응하는 N-(3-pyrene)maleimide,¹¹⁾ 아민기

와 반응하는 pyrene-1-sulfonate,¹²⁾ pyrene-1-sulfonyl azide¹³⁾ 등이 보고되어 있다. 또한 sulfonyl chloride기 (-SO₂Cl)는 일조조건하에서 아민기와 반응하여 sulfonamide를 정량적으로 생성하는 특성이 있다.

이에 저자 등은 pyrene을 모핵으로 하고 반응기로서 sulfonyl chloride기를 갖는 새로운 형광유도체 화제인 1-(N,N-dimethylamino)pyrene-6-sulfonyl chloride(이하 DAPS-Cl로 약함)를 합성하여 현재 활용되고 있는 형광유도체화제보다 반응이 간편하고, 생성된 유도체가 안정하며, 고감도인 형광유도체화제를 개발하여 그 특성을 검토코자 하였다. 합성된 형광유도체화제로 1급 및 2급 아민기를 갖는 ephedrine



Scheme 1—Reaction mechanism for formation of sulfonamide derivatives with 1-(N,N-dimethylamino)pyrene-6-sulfonyl chloride(DAPS-Cl).

및 norephedrine에 대해 실험하여본 결과 양호하게 유도체화반응을 하였으므로 이에 보고하고자 한다.

실험방법

시료 및 시약—1-Nitropyrene(Aldrich), 1-(N,N-dimethylamino)pyrene-6-sulfonyl chloride(DAPS-Cl, 자가합성 후 정제품), n-Hexane, ethylacetate, silica-gel 60G, DC-Alufolien Kieselgel 60, ephedrine(이상 E. Merck), norephedrine(Sigma), 기타 시약 1급 또는 특급을 사용하였다.

실험기기—IR : JASCO A202, Shimadzu IR 435, Spectrofluorometer : Shimadzu RF-540 with Data Recorder DR-3, MS : Kratos concept 1S, Jeol JMS-DX 303, NMR : BRUKER AC-200, HPLC : Spectra physics 8700(Rheodyne 7125 injector with 10 μl loop, Applied Biosystem 980 programmable fluorescence detector with 5 μl flow cell).

1-Aminopyrene의 합성—플라스크에 stannous chloride dihydrate 22.6g(0.1 mol)을 넣고 c-HCl 25 ml 및 glacial acetic acid 25 ml를 넣어 용해시킨 후, 1-Nitropyrene 4.95g(0.02 mol)을 교반하여 주면서 서서히 가했다. 이것을 40°C 물중탕에서 16시간 교반 하며 반응시킨 후 90분간에 걸쳐 온도를 서서히 올려

75°C가 되게 하였다. 이 내용물을 40% NaOH 용액으로 알칼리성이 되게 하고 실온까지 냉각한 후 분액깔대기에 넣고 diethyl ether 350 ml를 가해 추출한 후 분리된 diethyl ether층을 세척액이 중성이 될 때까지 증류수로 세척하였다. 이 diethyl ether층을 무수 Na₂SO₄로 탈수시키면서 여과하고 여액을 감압하에서 증발건고하였다. 이 증발건고물에 60% 에탄올 150 ml를 가해 95°C 물중탕에서 가열하여 용해시키고 서서히 냉각시켜 녹색의 침상결정 4.11g을 얻었다(수율 94.5%).

1-(N,N-dimethylamino)pyrene의 합성—플라스크에 1-aminopyrene 6.5g(0.03 mol)을 넣은 후 95% 에탄올 17 ml를 가해 가열용해시켰다. dropping funnel에 methyl iodide 8.5g(0.06 mol)을 넣고 서서히 가해주면서 95°C에서 4시간 반응시켰다. 이 반응액에 3N-NaOH 용액을 가해 알칼리성으로 한후 diethyl ether로 추출하였다. 이 diethyl ether층을 증류수로 세척한 후 탈수시켜 여과하고 여액을 감압하에서 증발건고하였다. 이 증발건고물을 동일한 조건으로 재반응시켜 수지상의 암록색 물질을 얻었다(수율 96.7%).

Sodium 1-(N,N-dimethylamino)pyrene-6-sulfonate의 합성—플라스크에 1-(N,N-dimethylamino)pyrene 6.2g(0.025 mol)을 넣고, 황산 60g(98%, 0.61 mol)을 교반하면서 서서히 가한 후 30분간 반응시켰다. 이 액을 교반하면서 ice water에 서서히 가해준 후 감압여과하고, 잔사를 ice water 및 에탄올로 세척하고 감압건조시켰다. 건조물에 1N-NaOH(methanolic)를 넣어 sodium salt로 하고 메탄올을 가해 용해시킨 후 여과하여 감압하에서 증발건고하였다. 이 때 암록색의 crude sodium 1-(N,N-dimethylamino)pyrene-6-sulfonate(이하 DAPS-ONa) 5.25g을 얻었다(수율 59.8%). 이 crude DAPS-ONa에 무수에탄올을 가해 물중탕에서 가열용해시킨 후 냉각하고 여과하여 얻어진 잔사를 무수에탄올로 세척하여 녹색의 결정성 분말 3.43g을 얻었다(수율 39.1%).

1-(N,N-dimethylamino)pyrene-6-sulfonyl chloride의 합성—2구 플라스크에 정제된 DAPS-ONa 2.26g(0.0065 mol)을 넣고 교반하면서 POCl₃ 15.0g(0.098 mol) 및 PCl₅ 2.71g(0.013 mol)을 가한 다음 실온에서 24시간 반응시켰다. 이 반응액을 분쇄된 얼음 1 kg에 교반하면서 서서히 가해주고, 분액깔대기에 넣어 diethyl ether로 추출하였다. diethyl ether층을 모아

Table I—Fluorescence properties of DAPS derivatives at the concentration of .5 $\mu\text{g/ml}$.

Compounds	Ex-max(nm) ^a			Em-max(nm) ^b			R.F.I. ^c		
	MeOH	MeCN	CH ₂ Cl ₂	MeOH	MeCN	CH ₂ Cl ₂	MeOH	MeCN	CH ₂ Cl ₂
DAPS-EPH	294	296	300	500	500	488	58.1	78.4	39.5
DAPS-NEP	294	294	304	498	498	488	75.6	74.4	53.6

^amaximum excitation wavelength, ^bmaximum emission wavelength, ^crelative fluorescence intensity

0.4% NaOH 용액으로 수층이 알칼리성이 될 때까지 세척하였다. diethyl ether층을 탈수여과한 후 여액을 감압하에서 증발건고하여 crude DAPS-Cl을 얻고, 이것에 carbon tetrachloride를 가하고 가열용해시킨 후 -20°C 에서 24시간 방치하여 재결정된 암적색의 판상결정 1.31g을 얻었다(수율 58.5%).

m.p. : $125\sim 126^{\circ}\text{C}$, TLC : cyclohexane : ethylacetate : benzene(2 : 1 : 1), Rf치 0.86, IR(cm^{-1} , KBr) : 1370, 1165(S=O), MS(m/z, rel. int.%) : 343(M^+ , $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{NSCl}$, 100.0), 345($\text{M}^+ + 2$, 42.3), 244($\text{M}^+ - \text{SO}_2\text{Cl}$, 48.2), 228($\text{M}^+ - \text{SO}_2\text{Cl} - \text{CH}_4$, 14.5), 201($\text{M}^+ - \text{N}(\text{CH}_3)_2 - \text{SO}_2\text{Cl}$, 3.6), ¹H-NMR(ppm, CDCl_3) : 3.06~3.13(ss, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 7.82~8.62(m, 8H, pyrene)

시료 및 DAPS-Cl와의 반응조작—ephedrine 및 norephedrine 각각 0.1 mmol을 증류수 10 ml에 녹인 다음 이 액에 0.1 M Na_2CO_3 용액을 가해 pH를 10.0으로 맞춘 후 DAPS-Cl의 아세톤용액(8 mmol/ml) 25 ml를 넣고 혼합시킨 다음 45°C 물중탕에서 60분간 교반하면서 반응시킨 후 실온까지 냉각시킨 다음 벤젠 20 ml로 추출한 후 HPLC법으로 분석하였다(Scheme 1). 또한 이 추출액을 감압하에서 증발건고한 후 잔류물을 아세톤 1 ml에 녹여 Silicagel 60G plate(20×20 cm, 층두께 : 1 mm)에 떠상으로 점적한 다음 cyclohexane : ethylacetate : benzene(2 : 2 : 1)의 혼합용매로 하여 분리, 정제하였다. UV 장파장하에서 황색형광을 나타내는 띠를 취하여 아세톤으로 추출한 다음 감압하에서 증발건고한 후 재결정하여 적황색의 결정(DAPS-ephedrine) 및 황색의 결정(DAPS-norephedrine)을 얻었다.

DAPS-ephedrine—IR(cm^{-1} , KBr), 1310, 1125(S=O), MS(m/z, rel. int.%) : 472(M^+ , $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}$, 20.9), 365($\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_5\text{CHOH}$, 28.2), 308($\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NCH}_3$, 21.8), 244($\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{N}(\text{CH}_3)\text{SO}_2$, 100.0), 228(244- CH_4 , 8.2), 201(228-NCH, 7.3), ¹H-NMR(ppm, CDCl_3) : 0.86~

0.99(m, 3H, $-\text{C}-\text{CH}_3$), 1.14~1.23(m, 3H, $-\text{NCH}_3$), 2.90~3.18(ss, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 4.20~4.25(m, 1H, $-\text{CH}-$), 7.01~7.24(m, 5H, C_6H_5), 7.73~8.82(m, 8H, pyrene)

DAPS-norephedrine—IR(cm^{-1} , KBr) : 3460(N-H), 1325, 1136(S=O), MS(m/z, rel. int.%) : 458(M^+ , $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}$, 59.1), 351($\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_5\text{CHOH}$, 3.6), 308($\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NH}$, 19.5), 244($\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NHSO}_2$, 100.0), 228(244- CH_4 , 8.6), 201(228-NCH, 8.2), ¹H-NMR(ppm, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$) : 2.54~2.72(ss, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.08(s, 1H, $-\text{NH}$), 6.59~6.71(m, 5H, C_6H_5), 7.42~8.45(m, 8H, pyrene)

HPLC 측정조건—HPLC : Spectra physics 8700, 검출기 : fluorescence detector, Ex 295 nm, Em 500 nm, 컬럼 : Lichrosorb Si60(4 mm i.d.×25 cm), 이동상 : n-hexane/ethylacetate(50/50), 유속 : 0.8 ml/min., 주입량 : 10 μl .

실험결과 및 고찰

DAPS-Cl의 합성—본 연구에서 채택한 1-nitropyrene의 amination은 Buu-Hoi¹⁴⁾의 방법을 사용하여 합성하였다. 1-aminopyrene의 dimethylation은 H. Lund,¹⁵⁾ V. Baliah¹⁶⁾ 및 Abe¹⁷⁾ 등의 방법을 이용하였다. Baliah는 methylation 시약으로 dimethyl sulfate를 사용하여 반복증류법에 의해 증류하여 정제하였으며, H. Lund와 Abe 등은 methyl iodide를 사용하여 유기용매 중에서 가온반응하였다. 본 연구에서는 상기의 보고서 방법을 비교 검토하여 Abe의 방법에 준하여 합성하였으며, 합성된 hydroiodide salt에 의한 반응의 진행저지를 막기위해 NaOH로 알칼리 가수분해 후 재반응시키는 방법을 사용하였다. 1-(N,N-dimethylamino)pyrene의 sulfonation은 Abe¹⁸⁾ 등이 pyrene을 sulfonation할 때 사용한 방법을 응용하였다. 부생성물을 제거하기 위하여 M. Corell,¹⁹⁾ W.W. Gro-

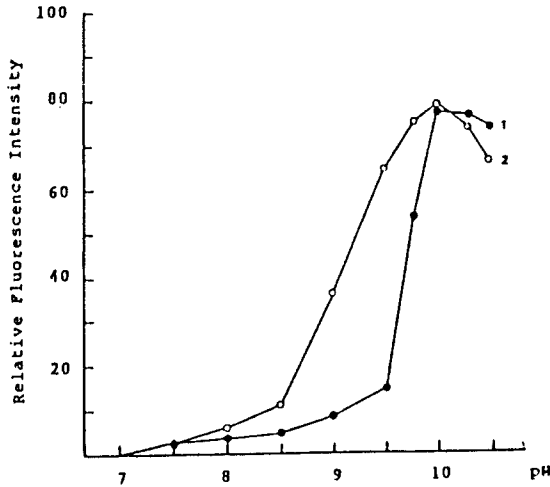


Fig. 1—Effects of pH on the derivatization.

1. ephedrine, 2. norephedrine

ves,²⁰⁾ Corell 등²¹⁾이 1-aminopyrene의 sulfonation시 1,6 유도체와 1,8 유도체를 분리하기 위하여 유기용매를 사용한 방법을 이용하여 무수에탄올에 가열용해한 후 용해되지 않는 1,6 유도체를 분리정제하였다. DAPS-ONa의 chlorination은 Mendel²²⁾이 dansyl chloride 합성시 사용한 방법에 준하여 합성한 결과 암적색 판상결정이 생성되었다. 이 물질은 상온에서 6개월간 보관시에도 안정하여 분해되지 않았고, 유기용매에 잘 녹았다.

형광특성의 검토—본 방법으로 합성한 DAPS-ephedrine 및 DAPS-norephedrine 유도체를 메탄올, acetonitrile 및 dichloromethane에 녹여 극대여기파장과 극대방출파장을 구하여 비교한 결과, 각 유도체는 치환기에 관계없이 동일한 용매에서 극대여기파장 및 극대방출파장이 거의 동일한 것으로 보아 fluorescence moiety는 pyrenyl기에 의한 것임이 확인되었으며(Table I), 이 유도체들은 254 nm의 UV광을 2시간 동안 조사하여도 안정하였다.

HPLC 측정조건의 검토—컬럼은 신속한 분석을 위해서 아미노산의 분석²³⁾에서와 같이 normal phase계 컬럼인 Lichrosorb Si60을 선택하였고, 이동상은 각 DAPS 유도체와 시약 분해물의 피크와의 분리상태, 분석소요시간 등을 고려하여 n-hexane과 ethylacetate의 50 : 50 혼합액으로 선정하였으며, 유속을 0.8 ml/min.로 하여 검토하였다. 검출과장은 각 DAPS

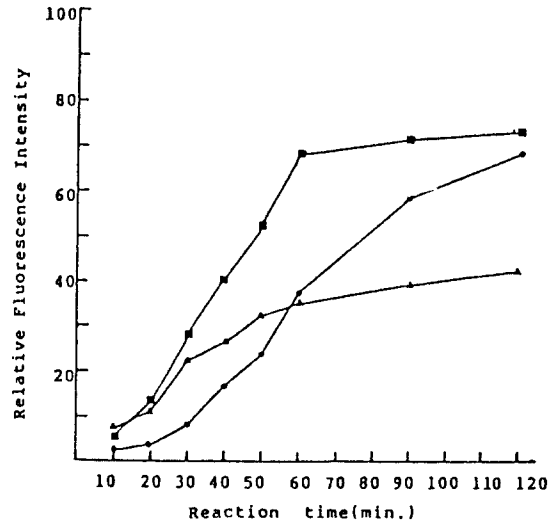


Fig. 2—Effects of reaction time and reaction temperature on the derivatization of ephedrine with DAPS-Cl.

●—● 35°C, ■—■ 45°C, ▲—▲ 55°C.

유도체의 acetonitrile에서의 극대여기파장과 극대방출파장을 각각의 여기 및 방출파장으로 선정하였다.

반응온도 및 반응시간의 영향—이상적인 형광유도체화반응은 부반응이 일어나지 않으면서 시료 및 생성된 유도체가 분해되지 않는 온도조건에서 단시간내 반응이 완료되어야 한다. ephedrine 및 norephedrine의 DAPS 유도체화반응에 미치는 반응온도 및 반응시간의 영향을 검토한 결과 최적반응온도 및 반응시간은 DAPS-ephedrine 및 DAPS-norephedrine의 경우 모두 45°C, 60분이었다. 일반적으로 반응온도가 상승될수록 반응은 단시간내에 이루어졌으나 분해산물이 증가하였고, 반응시간이 길어질수록 생성된 DAPS 유도체가 분해되었다(Fig. 2, 3).

pH의 영향—Sulfonamide 유도체를 만들 때 생성되는 HCl이 반응을 방해하므로 이를 방지하기 위해 반응온도 45°C, 반응시간 60분의 조건하에서 Na₂CO₃ 용액을 사용하여 각 물질의 유도체화반응시의 최적 pH를 검토한 결과 최적 pH는 모두 10.0이었다(Fig. 1).

DAPS-Cl의 농도가 반응에 미치는 영향—DAPS 유도체화 반응에 미치는 DAPS-Cl 농도의 영향을 검토한 결과, 최적농도는 DAPS-ephedrine의 경우 ephe-

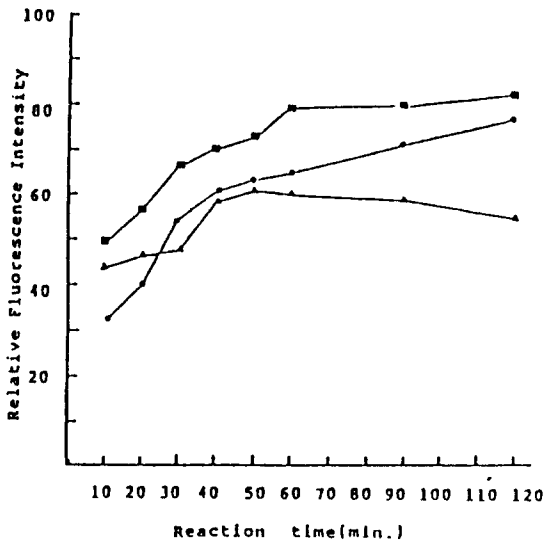


Fig. 3—Effects of reaction time and reaction temperature on the derivatization of norephedrine with DAPS-Cl.

●—● 35°C, ■—■ 45°C, ▲—▲ 55°C.

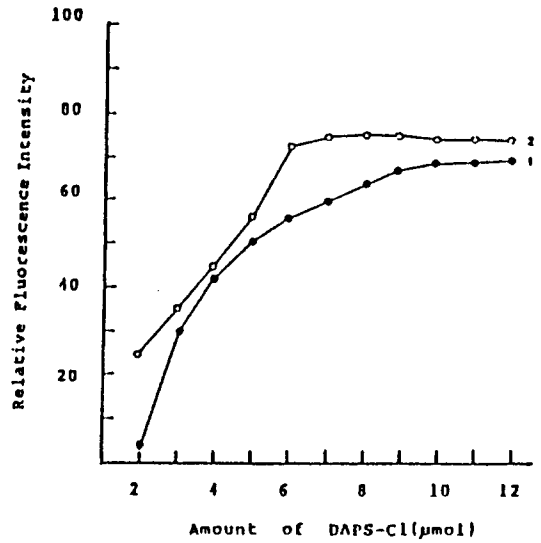


Fig. 4—Effects of amount of DAPS-Cl on the derivatization.

1. ephedrine, 2. norephedrine

drine 양(2 μmol)의 5배, DAPS-norephedrine의 경우 norephedrine 양(2 μmol)의 3배였다. 이는 dansyl chloride의 경우^{24,25)} 유도체화제의 농도를 7~20배 가하는 것에 비하면 유도체화 반응이 효율적으로 진행됨을 알 수 있었다(Fig. 4).

검량선 작성—ephedrine과 norephedrine의 표준액을 단계적으로 희석하여 각각의 농도가 25~125 nmol/ml가 되도록 용액을 만든 후 이 액을 각각 200 μl씩 취하여 전항의 반응조작법 및 HPLC 측정조건 하에서 실험한 결과, 양호한 직선성을 얻었다(Fig. 5).

재현성 검토—ephedrine과 norephedrine의 표준액 1 μmol 해당량을 취하여 전항의 반응조작법 및 HPLC 측정조건하에서 5회 실험한 결과 변이계수는 각각 0.9%, 2.3%로서 양호하였다(Table II).

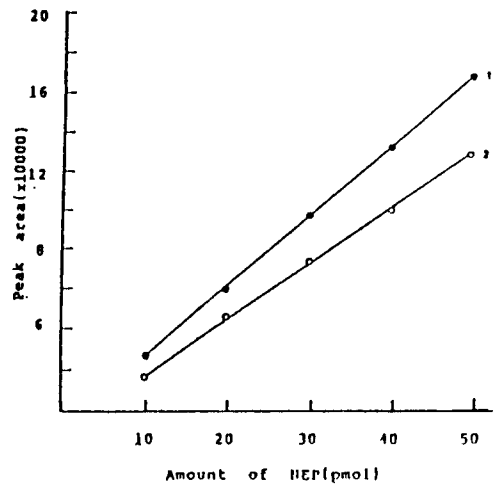


Fig. 5—Calibration curves.

1. ephedrine, 2. norephedrine

Table II—Reproducibility test of DAPS derivatives(n=5).

Compounds	Peak Area					Mean± S.D.	C.V.(%)
	1	2	3	4	5		
DAPS-EPH*	82919	84221	84123	85180	85133	84315± 826	0.9
DAPS-NEP**	109613	1032287	106959	109591	104689	106827± 2550	2.3

*DAPS-ephedrine derivative, **DAPS-norephedrine derivative

결 론

합성된 새로운 형광유도체화제인 DAPS-Cl은 mp. 125~126°C의 암적색 판상결정으로 상온에서 보관시 안정하였다.

이 형광유도체화제는 1급 및 2급 아민기에 쉽게 반응하여 sulfonamide 유도체를 형성하였다.

ephedrine 및 norephedrine은 45°C에서 60분간 반응시 DAPS-Cl과의 유도체화 반응이 쉽게 진행되었으며, HPLC로 분석할 때 10~50 pmol 범위에서 양호한 직선성을 나타냈고 재현성도 우수하였으며, 검출한계는 S/N비를 3으로 보아 각각 5 pmol이었다.

이 방법을 이용하면 각종 시료 중의 1급 및 2급 amine기를 함유하는 약물 및 생리활성 아민의 고감도 분석에 널리 응용될 수 있으리라 사료된다.

문 헌

- 1) Lee, Y.J., Lee, K.C., Lee, D.S., Yoon, Y.S. and Choi, J.S.: Spectrofluorometric determination of phenylephrine hydrochloride in dosage forms through dansyl derivative formation. *Sung Kyun Kwan Univ. J.* **10**, 1(1982).
- 2) Lee, Y.J., Lee, K.C., Lee, D.S., Yun, E.S. and Choi, J.S.: Noble method for the identification and determination of amphetamine and phenethylamine derivatives. *Sung Kyun Kwan Univ. J.* **32**, 281 (1982).
- 3) Lee, Y.J.: Fluorometric analysis of NBD and dansyl derivatives of drugs(Studies on *p*-hydroxy ephedrine and isoproterenol). *Sung Kyun Kwan Univ. J.* **35**, 31(1984).
- 4) Koh, I.B., Lee, K.C. and Oh, I.J.: Fluorescence and stability of dansylated dopamines. *Chonnam Univ. J.* **30**, 17(1985).
- 5) Lee, Y.J. and Rhu, H.I.: Reaction of phenethylamine-derivatives with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole and its application to fluorometric analysis. *Sung Kyun Kwan Univ. J.* **36**, 297(1985).
- 6) Nakagawa, T., Aoyama, E., Hasegawa, N., Kobayashi, N. and Tanaka H.: High-performance liquid chromatography-fluorometric determination of selenium based on selenotrisulfide formation reaction. *Anal. Chem.* **61**, 233(1989).
- 7) Chun-Xin Gao, Tzun-Yu Chou and Ira, S. Krull: Polymeric activated ester reagents for off-line and on-line derivatizations of amine nucleophiles in high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *Anal. Chem.* **61**, 1538(1989).
- 8) Frust, M., Kallmann, H. and Brown, F.H.: Fluorescence efficiencies of organic compounds. *J. Chem. Phys.* **26**, 1321(1957).
- 9) Kamada, S., Maeda, M. and Tsuji, A.: Fluorescence HPLC determination of free and conjugated bile acids in serum and bile using 1-Bromoacetylpyrene as a pre-labeling reagent. *J. Chromatogr.* **272**, 29(1983).
- 10) Nimura, N. and Kinoshita, T.: 1-Pyrenyldiazomethane as a fluorescent labeling reagent for liquid chromatographic determination of carboxylic acid. *Anal. Chem.* **60**, 2067(1988).
- 11) Joel, K., Weltman, Robert P. Szaro, A. Raymond Frackelton, Jr. and Robert M. Dowben: N-(3-pyrene)maleimide; a long lifetime fluorescent sulfhydryl reagent. *J. Biol. Chem.* **248**, 3173(1973).
- 12) Nakabayashi, M. and Mihashi, K.: Fluorescence of 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonate conjugated to bacteriorhodopsin. *Photochem. Photobiol.* **33**, 449(1981).
- 13) Ros, J.M.G., Fernandez, P.C., Sator, V. and Carrion M.M.: Pyrene sulfonyl azide as a fluorescent label for the study of protein-lipid boundaries of acetylcholine receptors in membranes. *J. Supramol. Struct.* **11**, 327(1979).
- 14) Buu-Hoi, N.P., Roussel, O. and Petit. L.: Amination of pyrene. *J. Chem. Soc.*, 956(1963).
- 15) Hakon Lund and Arne Berg: Pyrene studien III. *Kgl. Danske Videnskat. Selskat., Mat. Fys. Medd.* **22**, 1(1946).
- 16) Baliah, V. and Krishnapillay, M.: Ultraviolet absorption spectra of some monosubstituted pyrenes. *Indian J. Chem.* **9**, 815(1971).
- 17) 安倍義人, 小林三男: N-Methylation of 1-aminopyrene, 中央大學 理工學部 紀要 **18**, 195(1975).
- 18) 安倍義仁, 徐培正: Preparation of free-1-pyrenesulfonic acid, 有機合成化學. **33**, 277(1975).

- 19) Corell, M.: Aminopyrene-sulphonic acids and a process of preparing them. *U.S. Patent* 246,249 (1936).
- 20) Groves, W.W.: Manufacture of substituted 3-aminopyrenes, *G.B. Patent* 472,398(1937).
- 21) Corell, M., Vollmann, H. and Becker, H.: Substituted 3-aminopyrenes and process of preparing them. *U.S. Patent* 2,185,661(1940).
- 22) Mendel, A.: An improved preparation of 5-dimethylamino-1-naphthalene sulfonyl chloride. *J. Chem. Eng. Data* **15**, 340(1970).
- 23) Bayer, E., Grom, E., Kaltenecker, B. and Uhmann, R.: Separation of amino acids by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **48**, 1106(1976).
- 24) Frei, R.W., Tomas, M. and Frei, I.: A study of adrenaline-dansyl derivatives for separation by liquid chromatography. Application to blood plasma analysis. *J. Liq. Chromatogr.* **1**, 443(1978).
- 25) Matsuyama, K., Miyazaki, C., Yamashita, T. and Ichikawa, M.: Fluorometric determination of valproic acid in mouse brain by HPLC and applications to pharmacology. *Bunseki Kagaku* **38**, T174(1989).