アルミニウムアマルガムによるストレプトマイシンの 還元に関する研究 (第2報)

反応経過の検討と反応中間体の推定構造

藤 巻 逸 夫, 辻 啓 一

(理 化 学 研 究 所)

昭和 45 年 5 月 20 日 受 理

Studies on the Reduction of Streptomycin with Aluminum Amalgam Part II. Examination of the Reaction Process and Structure of the Reaction Intermediate

By Itsuo FUJIMAKI and Keiichi TSUJI

The Institute of Physical and Chemical Research Yamatomachi, Saitama, Japan

The progress of reduction of streptomycin (SM) with aluminum amalgam, which finally produces dihydrodeoxystreptomycin (DDS) was pursued by combination of analytical methods developed for this study. It was made clear that DDS is the reduction product of an unknown reaction intermediate. Based on the previous results and the consideration of the rate process, it was concluded that this intermediate is produced by the reduction of streptomycin at the tertiary hydroxyl group on C-3 of streptose: i. e., its structure presumed to be 1-(1,3-diguano-2,4,5,6-tetrahydroxycyclohexanido)-2-(N-methyl- α -L-glucopyranosido)-3-C-formyl-3,5-dideoxy- α -L-pentofuranose. This intermediate product may be termed deoxystreptomycin (DOS). (Received May 20, 1970)

緒 言

前報⁽¹⁾において、ストレプトマイシン (SM) を酸性に於いてアルミニウムアマルガム (Al-Hg) で還元する途中のある段階で一種の未知生成物が生じ、この1モルが pH 2~4 における水蒸気蒸留によりほとんど定量的に1モルのカルボニル化合物を留出することを認め、その構造を 2-methyl-3-formylfuran (MFF) と推定し、合成により確認した。本報においては SM の Al-Hg による還元反応の経過を追跡し、MFF の母体である上記の未知生成物がジヒドロデオキシストレプトマイシン (DDS) に至る唯一の反応中間体であることを確かめ、またその構造を推定した。

実験方法および結果

定量法について

SM および Al-Hg 還元の際の反応生成物を量的に検

討するための定量分析を行なうについては、後述するように従来用いられてきた SM, DDS の定量法が適当でないことが認められたので、この試料に適した分析法を開発する必要があった。以下にその概略を述べる。

(1) SM の定量: SM の定量法としては、化学的検定法としてマルトール検定法が広く使用されている。この方法は SM のアルカリ分解によってストレプトース部分から生ずるマルトール (3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone) の塩化第二鉄による呈色を利用するものである⁽²⁾。純粋な SM または DS, DDS と共存する SM に適用した場合には呈色は赤紫色であり、530 m μ に吸収極大を生ずるのに対し、Al-Hg を用いて部分的に還元した SM について適用すると赤褐色の呈色を生じ、530 m μ には吸収極大が見られない (Fig. 1)。検討の結果、想定される還元中間体またはその分解物が、塩化第二鉄によるマルトールの呈色を妨害するためによることを知ったので、この研究においては塩化第二鉄を用いず、アルカリ分解

液中のマルトール自身の吸収 (0.1 N 水酸化ナトリウム溶液中で $\lambda_{\max}$ 323 m μ) を利用して SM の定量を行なった。この方法は中間体の存在によってほとんど妨害を受けず、塩化第二鉄を用いる方法よりもはるかに低濃度

Fig. 1. Absorption Spectra of Colored Solutions obtained by the Action of Ferric Chloride on Alkaline Degradation Products of Pure SM (1) and that of Incompletely Reduced SM (2).

(1) SM 3/2 H_2SO_4 15.9 mg/25 ml.

(2) Incompletely reduced SM 3/2 H_2SO_4 , containing 15.9 mg SM 3/2 H_2SO_4 and 3.4 mg sesquisulfate of the unknown compound in 25 ml.

FeCl_3 12.5 mg/25 ml.

Fig. 2. Absorption Spectrum of Maltol in Alkaline Degradation Product of SM (0.1 N NaOH).

SM 3/2 H_2SO_4 58.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

の SM の定量について使用することができる。

(2) 操作法: SM 3/2 硫酸塩の 80 mg 以下の試料を含む 1 ml を取り、必要があれば 1 N 水酸化ナトリウムで中和して中性とした後、1 N 水酸化ナトリウム 2 ml を加え沸騰水浴中で 10 分間加熱し、冷水で冷却後希釈して 100 ml とする。この液の 2 ml をとり 1 N 水酸化ナトリウム 1.8 ml を加えて 20 ml に希釈し、空試験を対照として $\lambda_{\max}$ 323 m μ における吸収を 10 mm セルを用い測定する。部分還元した SM 溶液はアルカリ性で加熱することにより淡褐色を呈するが、希釈倍数が高いため 323 m μ におけるマルトール吸収の測定にはほとんどの場合影響ない。各種濃度の SM を含む試料を用いて作成した検量線は原点を通る直線となる。試料中の SM がより低濃度の場合には、他に不都合のない限り希釈倍数をへらして低濃度の限界を延長することができる。

(3) DDS の定量: DDS はアンスロン-硫酸による呈色による比色法で定量しうる⁽⁹⁾。SM および DS はこの方法で全く呈色しない。しかし Al-Hg を用いて部分的に還元された SM 溶液の呈色は純粋な DDS のそれとは異なった吸収曲線 (Fig. 3) を示す。これは SM または DDS 以外に還元液中に存在する物質、おそらく還元の間体がアンスロン-硫酸により呈色し、その吸収

Fig. 3. Absorption Spectra of Colored Reaction Mixture of (1) Incompletely Reduced SM 1.21 mg/5 ml (content DDS, SM, intermediate) (2) the Same, After Reduction with NaBH_4 and (3) DDS 3/2 H_2SO_4 , 0.75 mg/5 ml.

が DDS の吸収と重複しているものと考えられる。したがって、この妨害を除くため種々の方法を試み、マルトール法による SM の定量におけるアルカリ分解の条件の下において、上記の物質が分解を受けて DDS の定量を妨げないものに変化することを見出した。同じ条件の下で DDS 自身もおそらく分解を受けるとされるが、純粋な DDS の呈色はアルカリ分解処理により全く影響されないことを確かめた。したがって、本実験では前記の SM の定量法におけるアルカリ分解液の一部を採ってアンスロン-硫酸法による DDS 定量の試料とした。また pH 2~4 において水蒸気蒸留することにより妨害物質を分解除去した残液を試料として用いても、同様に妨害なく DDS を定量することができる。DDS 自身の呈色はこの処理によって影響を受けない。

(4) 操作法: アンスロン-硫酸試薬はアンスロン 0.2 g を濃硫酸 100 ml に溶解し直ちに使用する。

DDS 約 20 mg を含む反応液を 1N 水酸化ナトリウムで pH を中性にし、1N 水酸化ナトリウム 2 ml を用い 10 分間 100°C に加熱し 100 ml とする (または水蒸気蒸留し蒸留残液を使用する)。その一部は SM の定量に用い残部の 5 ml をとり、水冷した上記の試薬 10 ml 中に徐々に加え、冷却器をそなえた試験管中で沸騰水浴中で 25 分間加熱後冷却し、空試験を対照として $\lambda_{\max}$ 525 m μ における吸光度を測定し、検量線から DDS の量を求める。検量線は DDS 0.0~1.5 mg の範囲で原点を通る直線となる。

未知生成物の定量

前報に報告したように、未知生成物は pH 2~4 にお

いて水蒸気蒸留すると定量的に MFF を生ずる。これを利用して、留出液中の MFF の UV 吸収 ($\lambda_{\max}$ 271 m μ , ϵ = 6310) の強度から定量した。あるいは中間体が NaBH_4 還元により定量的に DDS となることにもとづき、反応液を NaBH_4 還元してアンスロン-硫酸法により DDS の量を定量し、その値から還元前の反応液中の DDS の量を差引き、 NaBH_4 還元によって増加した DDS の量を求めれば、やはり中間体の量を求めることができる。

薄層クロマトグラフィー (TLC)

展開溶媒にベンゼン-酢酸エチル 9:1 を用い、発色剤に 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬、および水酸化カリウムメタノール溶液⁽⁴⁾を使用した。

Al-Hg 還元反応の経過

前報と同様の方法で還元した。すなわち、SM 3/2 硫酸塩 14.4 g を蒸留水に溶解し 190 ml とし、50% 硫酸を加え pH 2.0 とし 35°C に加温する。これに Al-Hg 4.35 g を加え 35~40°C, pH 2.0 に保ち攪拌反応させる。還元反応途中、適当な間隔で試料を 10 ml ずつ採取しその各々について、先に述べたマルトール反応による SM 残存率、およびアンスロン-硫酸法による DDS 生成率を測定した。また上記の各試料を NaBH_4 を用いて還元し、その各々についてアンスロン-硫酸法を用いて DDS の NaBH_4 還元による増加率を測定した。また各試料について水蒸気蒸留を行ない、留出液の 271 m μ における吸収強度から MFF の生成率を測定した。定量結果は反応中の硫酸の添加による希釈について補正を行なった。このようにして得られた SM 残存率 (A), DDS 生成率 (B), NaBH_4 還元による DDS 増加率 (C), 水蒸気蒸

Table I. Analytical Change during the Reaction of Streptomycin with Aluminum Amalgam

Reaction time (min)	(A)		(B)		DDS content % after NaBH_4 reduction	(C)		(D)	(E)
	SM content %	DDS content %	SM content %	DDS content %		DDS formed by NaBH_4 reduction	MFF formed by steam distillation		SM + DDS + intermediate
0	0	100.0	0	0	0	0	0	0	100.0
1	10	80.0	4.5	14.5	14.5	10.0	9.7		94.5
2	20	67.3	9.1	28.0	28.0	18.9	17.9		95.3
3	30	58.0	16.0	36.8	36.8	20.8	19.6		94.8
4	40	47.8	23.4	49.3	49.3	25.9	25.3		97.1
5	50	41.6	32.4	55.8	55.8	23.4	23.3		97.4
6	60	36.9	44.1	65.3	65.3	21.2	20.0		102.2
7	100	19.6	70.5	80.7	80.7	10.2	10.1		100.3
8	120	13.4	76.7	87.5	87.5	8.8	8.5		100.9
9	150	8.1	84.0	90.6	90.6	6.6	6.4		98.7
10	180	5.3	92.5	94.7	94.7	2.2	2.1		100.0

Fig. 4. Analytical Change during the Reaction of Streptomycin with Aluminum Amalgam.

留による MFF の生成率 (D) を, 反応開始前の SM に対するモル%として Table I および Fig. 4 に示す.

前報の結果によれば, 未知の生成物は NaBH_4 還元により DDS を, また水蒸気蒸留により MFF を定量的に与える. ゆえに還元液の NaBH_4 還元による DDS の増加 (曲線 C), また水蒸気蒸留留出液中の MFF の量 (曲線 D) は, 両者ともに推定される中間体のモル量に等しいはずで, 事実 C, D の曲線は互いによく一致し, 約 40 分還元後に最大となり以後 DDS 量の増加とともに減少する. 還元液中の物質収支をあらわす曲線 E は, 還元終了時まで, おおむね 100% に近い一定値を示している.

還元経過についての考察

Table I, Fig. 4 に見るように, NaBH_4 還元により DDS を, また水蒸気蒸留によって MFF をいずれも定量的に与える未知物質 X の量は, 還元開始後 40 分で液中における量が最大となり, 以後ゆっくりと減少する. このような挙動は, 明らかに逐次反応における中間体の挙動である. すなわち, この未知物質は,

の逐次反応における中間体 X であると解釈するのが至当である. 一般に逐次反応における中間生成物は, 第 1 段の反応の速度定数 k_1 が第 2 段の定数 k_2 より著しく小さい限り極大値を示す. この極大点においては

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1[\text{SM}] - k_2[X] = 0 \quad (2)$$

の関係が成立つ. ただし $[\text{SM}]$ および $[X]$ はそれぞれ

SM および未知物質の液中の濃度である. 実際の SM の Al-Hg による還元は金属表面における不均一反応であり, 見かけの速度定数 k_1, k_2 は攪拌時の因子により変化するので厳密に取扱うことは不可能であるが, Table I における反応開始後 40 分の SM 濃度と X の濃度から, この実験条件下では

$$k_1 \approx \frac{1}{2} k_2$$

であることが推定された.

未知生成物質の検討

前報および本報の結果を総合すれば, 未知生成物は, SM の Al-Hg 還元における中間の生成物であることがほとんど確実である. この物質が, Al-Hg のみならず NaBH_4 によっても DDS を与えるという事実を考えれば, DDS を生ずる反応がストレプトース部の C-6 のアルデヒドの還元であること, したがって SM から中間体を生ずる反応が C-3 の第三級水酸基の還元であることはほぼ疑いない.

Al-Hg による水酸基の還元はむしろ例外的であるが, α -hydroxycarbonyl 化合物についてはいくつかの例が

Fig. 5

- R_1 = Streptidine
 R_2 = N-Methyl-L-glucosamine
 (1) Streptomycin
 (2) Deoxystreptomycin
 (3) Dihydrodeoxystreptomycin
 (4) 2-Methyl-3-formylfuran
 (5) Dihydrostreptomycin

知られている。たとえばアセトインよりメチルエチルケトンが得られており⁽⁴⁾, また辻は SM のモデル化合物として α -hydroxyisobutylaldehyde を Al-Hg または定電位水銀陰極で還元してイソブチルアルデヒドの生成を確認している⁽⁶⁾。Kabasakalian ら⁽⁶⁾は estrone-1, 6- β -ol その他の化合物の滴下水銀陰極におけるポーラログラフ還元波を第三級水酸基の還元として説明していて, これもおそらく同種の反応に属する。この種の反応がすべて Al-Hg, 定電位水銀陰極など負の電位を持つ金属表面上でのみ起こることは注目すべきである。

前報に述べた未知生成物からの MFF の生成も, 上記の中間体の推定式を支持する。推定分子式と MFF の分子式を比較すれば, 後者は前者から結果として R_1OH , R_2OH が脱離したものに相当し, SM, DS, DDS からは酸化または還元を経ることなく生成する可能性はない。構造上から見ても, MFF はストレプトースから由来したデオキシ糖, すなわち, 3-deoxystreptose のフuranose 環が開環することなく芳香環化したものと見るのが至当であると思われる。

DDS の酸化分解による MFF の生成

前記の中間体の推定構造が正しいとすると, DDS の dihydrodeoxystreptose 部分の C-6 の第一級水酸基を酸化してアルデヒドとすれば, 上記の中間体の中央部の糖と等しくなり, これを前報に述べたように pH 2~4 において水蒸気蒸留すれば MFF が生成しなければならない。ただし N-methyl-L-glucosamine (NMG) の末端の第一級水酸基も酸化されると思われるが, おそらく MFF の生成には関係ないと思われる。酸化剤としては二酸化マンガン, 活性二酸化マンガンを試み, 市販の二酸化マンガン (純正化学製) が最も良い MFF の収量を得た。すなわち DDS 3/2 硫酸塩 5.0 g (あらかじめ水蒸気蒸留し, MFF が認められない試料を使用する) を蒸留水 25 ml に溶解し, これに 1 N 硫酸を加え pH 2.5 とし, 二酸化マンガン 30 g を加えよく振盪し 1 昼夜放置する。濾過後, 濾液を水蒸気蒸留し, 留出液の UV 吸収スペクトルを測定すると 271 m μ に強い吸収を示す。その強度から MFF の量を計算すれば, 用いた DDS の 6.1% に相当する。留出液の一部に 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンの 1 N 塩酸溶液を加えて放置し, オレンジ色の沈殿を濾過, 乾燥する。mp 225~226°C, $\lambda_{CHCl_3}^{max}$ 378 m μ ($\epsilon=27, 100$)。前報で報告した MFF の 2, 4-dinitro-phenylhydrazone と混融して融点降下を示さなかつ

た。また活性二酸化マンガンをも試みたが収量は 3% にすぎなかった。

以上の知見から, 第 1 報でその存在が確認された SM の Al-Hg 還元途中に生成する未知の生成物は 1-(1, 3-diguanido-2, 4, 5, 6-tetrahydroxy-cyclo-hexanido-2-(N-methyl- α -L-glucopyranosinido)-3-C-formyl-3, 5-dideoxy- α -L-pentofuranose) であることが確実である。以下の報告では上記の化合物を deoxystreptomycin (DOS) と呼ぶこととする。DOS より MFF の生成は, それが弱酸性または中性の溶液中で, 室温でも容易に起こる点で興味深い。この反応に関する研究の結果は第 3 報以下に報告する。

要 約

SM が Al-Hg 還元によって DDS に還元される反応経過を新たな定量法により追跡した結果, SM が DDS になる途中に未知の還元中間体の一種が生成することを明らかにした。その生成量は用いた SM の最大 25 モル% に達し, この未知物質は SM のストレプトース部の C3 のヒドロキシル基が還元された物質であると推定した。DDS を二酸化マンガン等の酸化剤で酸化し, 水蒸気蒸留すると低収量ではあるが, 2-methyl-3-formylfuran (MFF) が生成する事実も上記の推定を支持する。すなわち中間体の構造は, 1-(1, 3-diguanido-2, 4, 5, 6-tetrahydroxycyclohexanido-2-(N-methyl- α -L-glucopyranosinido)-3-C-formyl-3, 5-dideoxy- α -L-pentofuranose) と推定される。以後の報告では上記の化合物を deoxystreptomycin (DOS) と呼ぶ。

本報の要旨は昭和 45 年 4 月 2 日, 日本農芸化学会大会で講演した。

本研究に際し, 飯田貞治郎博士, 理化学研究所池田博主任研究員, 江本栄主任研究員, 実験を補助された久米信子の諸氏に感謝する。

- (1) 藤巻逸夫, 辻 啓一: 農化, **44**, 463 (1970).
- (2) G. E. Boxer, V. C. Jelinek and P. M. Leghorn: *J. Biol. Chem.*, **169**, 153 (1947); *ibid.*, **170**, 491 (1947).
- (3) M. Katayama, H. Ikeda and H. Ikeda: *Sci. Paper. I. P. C. R.*, **54**, 420 (1960).
- (4) A. Kling: *Ann. Chim. e. Phys.*, (8) **5**, 506, 533 (1905).
- (5) K. Tsuji: *Agr. Biol. Chem.*, **25**, 432 (1961).
- (6) P. Kabasakalian and J. McGlotten: *Anal. Chem.*, **31**, 1091 (1959).