279. 岡野定輔, 深川安彦: アゾ蛋白免疫法の研究 (第1報) 変性蛋白質 (1)
SH 基試薬 Porphyrindin の合成について

Sadasuke Okano and Yasuhiko Fukagawa: Studies on Azoprotein
Immunization. I. Denatured Proteins. (1). Synthesis of
Porphyrindin, a Reagent for Thiol Group.

(Pharmaceutical Department., University of Kumamoto*)

アゾ蛋白免疫法の研究に関連して我々は変性蛋白質の性状を検討する必要を生じた。蛋白の変性度の測定は多くの場合変性によつて露出される SH 基の定量にもとづいており、このための SH 基の酸化剤としてはチスチン、
$$R-S-S-R + HOH \longrightarrow R-SH + R-SOH$$

ヨード等¹⁾、2,6-dichlorophenol-indophenol²⁾ ニトロブルシッド³⁾、aneurine disulfide⁴⁾ 等が用いられているが何れも我々の目的に適合しない。porphyrindin(VIII)は水に易溶、冷時中性溶液で SH 基を容易に酸化($E_0 = +0.57$ Volt, pH 7.0) して脱色する性質があり⁴⁾、Greenstein⁵⁾ はこれがすぐれた蛋白変性試薬であることを紹介した。然しながら、この試薬の合成に関しては今日まだ満足すべき方法がなく、このすぐれた変性試薬の実際の応用は著しく制限されている状態である。porphyrindin は最初 Piloty⁶⁾ 等によつて合成され後 Kuhn 等⁷⁾、最近では Lillevik 等⁸⁾ が合成法に関して報告している。著者等は上述の必要から本試薬を合成し若干の知見を得た。

前記 Piloty, Kuhn 及び Lillevik 等の合成過程はいずれも acetoxime (I) から出発し、 α -hydroxyaminoisobutyronitrile (II), α -hydroxyaminoisobutyro ethyl iminoether dihydrochloride (III), α -hydroxyaminoisobutyroamidene hydrochloride (IV), α -nitrosoisobutyroamidene hydrochloride hydrate (V), porphyrin (VI), leucoporphyrindin (VII) を経て porphyrindin (VIII) に到達している。著者等も大体この経路によつたが、まずオキシム (I) に青酸を作用させてニトリル (II) とするに際し Piloty 等は無水青酸を使用、Kuhn 等は無水青酸では反応物は油状となつてニトリルを得ず 70~80% HCN を用いると得量がよいと報告しているが、著者等は無水青酸を用いて約 10% の得量でニトリルを得た。反応後青酸を蒸発した残渣は原料オキシムより 20~30% 重量を減ずるのでアセトキシムは無水青酸により一部分解するものと思われる。オキシムとニトリルの分離については Miller の石油エーテルによる方法では繁殖且つ完全に分離できない。著者等はエーテルに対する両者の溶解度の差を利用して容易且つ完全に分離し得た。

イミノエーテル (III) は (II) を無水アルコールで乾燥塩酸ガスを飽和させて得るが、無水の条件は厳守しなければならない。(III) の融点は Piloty: 110°, Kuhn: 200°, Lillevik: 180° と一致していない。著者等の得たものは mp 200° (decomp) で Kuhn の報告と一致した。塩酸ガスの量が少ないときは mp 100~105° (decomp) のものを得るが、これを塩酸で処理すると (X) を得るのでニトリル (II) の塩酸塩 (IX) であると思われる。なお Piloty は mp 110° (decomp) のイミドエーテルから mp 89° (decomp) のニトロソ酸エステル体を得ているが、著者等も mp 200° (decomp) のものから同様に mp 89° (decomp) の (XI) を得た。アミジン (IV) は (III) を無水アルコール中アンモニアと反応して得られる。著者等ははじめ目的とする結晶を得ず反応成績体は油状となつた。Lillevik はアンモニアガスを導通するという Piloty の方法でこの油状物を得たと報告している。著者等はこの油状物を検討するため濃塩酸で処理して mp 187~189° (decomp) の結晶 (XII) を得た。このものは冷時

* Oe-cho, Kumamoto.

1) M. R. Mirsky, A. E. Anson: J. Gen. physiol. **18**, 307 (1935).

2) A. Todrick, E. Walker: Biochem. J. **31**, 292 (1937).

3) A. E. Anson: J. Biol. Chem. **135**, 797 (1940).

4) 佐橋, 柴崎: 農化 **25**, 57 (1951).

5) R. Kuhn, W. Franke: Ber. **65**, 1528 (1935).

6) J. P. Greenstein: J. Biol. Chem. **125**, 501 (1938); **128**, 233 (1933); **130**, 519 (1939); **136**, 795 (1940).

7) O. Piloty, B. G. Schwerin: Ber. **34**, 1867 (1901); O. Piloty, Vogel: Ibid. **33**, 1283 (1903).

8) R. Kuhn, W. Franke: Ibid. **68**, 1528 (1935).

9) H. A. Lillevik, R. L. Hossfeld, H. V. Lindstrom, R. T. Arnold, R. A. Gortner: J. Org. Chem. **1942**, 165.

クロールで処理すると mp 158~160° (decomp) の結晶 (XIII) となる。(XIII) は重曹で発泡せず青酸カリ反応陰性、硫酸第一鉄による nitrosoamidine の呈色反応⁹⁾ 陰性である。さらにニトリル (II) を氷冷下濃塩酸で処理後クロール処理して得たもの (XIII) と油状物を冷時塩酸及びクロールで処理して得たものとは混融して融点降下しなかつた。よつて著者等はこの油状物を (XII) の遊離塩基と推定する。この油状副成物は反応中及び反応後の処理で温度を常温以上にするとか無水の条件で行わないとき多く生ずるようである。アミジン塩酸塩の分解点も文献値が一致していない (Piloty : 154°, Kuhn : 140~240°)。著者等の得たものは mp ca. 154° (decomp) であるが注意して徐々に温度を上げて観察するとき 140~190° で徐々にガスを発生して最後に分解するのを認めた。ニトロソ体 (V) は (IV) の酸性溶液にクロールを断続的に通じて酸化する Lillevik 等の方法で容易に得られる。ポルフィレキシン (VI) は (V) に青酸カリを作用させて得るが 55~60° に加温すると激しく発熱して直ちに褐色の澄明溶液となり、冷却すると (VI) が析出する。このものは更に精製することなく次の反応に使用することができる。ロイコ塩基 (VII) は (VI) にヒドラチンヒドラートを作用させて得るが Kuhn 等の報告の通り正確に 1/2 mol 加えることが必要で Piloty 等の報告のように過剰にすると目的のものを得られず、反応物はシロップ状になる。ポルフィリジン (VIII) は (VII) を $K_3Fe(CN)_6$ で酸化して容易に得られる。

本研究の一部は昭和 27 年度文部省科学研究費によつた。御助言を賜つた恩師石館守三先生に謹謝する。

実 験 の 部

α -Hydroxyaminoisobutyronitrile (II) アセトキシム 85 g (1 mol) に無水青酸 85 g (3 mol) を加え 0~5° で 8 日間時々振とうして放置し更に 1 日間室温に放置する。反応後常温で青酸を蒸発すると 65 g の残渣を得。これを冷時半量のエーデルで 2 回処理して未反応のオキシムを除くと純粋な (II) の白色結晶 12 g を得。mp 99°。

α -Hydroxyaminoisobutyroethyl iminoether dihydrochloride (III) (II) の 12 g を無水アルコール 100 cc 中に懸濁し氷冷しつつ乾燥塩酸ガスを飽和して完全に溶かし、反応液を 0~5° に一夜放置すると (III) の白色結晶 23 g を得。mp 200° (decomp)。

α -Hydroxyaminoisobutyroamidine hydrochloride (IV) (III) の 12 g を無水アルコール 35 cc に懸垂して激しく攪拌しつつ無水アルコール・アンモニア (4.6 g/cc) 29 cc を 30 分間で滴下。後 15~20° で 4 時間

9) O. Piloty, B. G. Schwerin : Ber. **34**, 1863 (1901).

攪拌し析出した塩化アンモン (3.3 g) を濾去し, アルコールを減圧濃縮すると (IV) の白色結晶 6.5 g を得. mp ca. 154° (decomp).

α -Nitrosoisobutyroamidine hydrochloride hydrate (V) (IV) の 3.5 g を水 17 cc, 濃塩酸 0.5 cc に溶かし氷冷してクロルを徐々に通ずると暫時の後結晶が析出. クロルの過剰は反応液が紫色に着色しはじめるのでわかる. 結晶を少量の水で洗うと白色の (IV) の結晶 2.6 g を得.

Porphyrexin (VI) (V) の 2.6 g を 35.6 g/cc の青酸カリ 4 cc に加え 55~60° に加温すると直ちに激しく発熱して褐色の澄明液となる. 暫時の後氷冷して析出した結晶を濾取水洗す. 収量 2.3 g. mp 249~250° (decomp).

Leucoporphyrindin (VII) (VI) の 1.2 g を水 4 cc にとかし正確に 0.16 cc (92 g/cc) のヒドラチンヒドドラートを加え室温で約 10 分間振とうし沸とうさせて約 1 時間反応後シロップ状になるまで濃縮. 少量の冷水を加えて放置すれば (VII) の結晶 0.3 g を得. mp 270~274° (decomp).

Porphyridin (VIII) (VII) の 0.3 g を *N*NaOH 1.9 cc に溶かし, これにフェリシアンカリ 0.6 g を水 24 cc に溶かした液を氷冷しつつ徐々に加える. 液は直ちに青変. 0~5° に 1 夜放置後析出した濃青色の結晶を濾取しビリジンにとかして不純物を濾去後, 液を濃縮してポルフィリンジン (VIII) の濃青色結晶 0.15 g を得. mp 183° (decomp).

熊本大学薬学部

Summary

The methods of Piloty (1901, 1903), Kuhn (1935), and Lillevik (1942) for the synthesis of porphyrindin (reagent for the thiol radical) were examined. It was thereby confirmed that the oily substance formed as a by-product during the derivation of α -hydroxyaminoisobutyro ethyl iminoether (III) to the isobutyroamidine (IV) is the free base of the acid amide (XII). It was found that a larger amount of this oily product is formed when the reaction is not carried out under anhydrous conditions or when the reaction temperature is raised above the normal.

(Received June 14, 1954)

280. 富田眞雄, 井川健二: Diphenyl Ether を基核とする Acid Hydrazide 誘導体の合成研究 (第 1 報¹⁾)

Masao Tomita and Kenji Ikawa: Syntheses of Acid Hydrazide Derivatives Containing Diphenyl Ether Nucleus. I¹⁾.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto*)

Diphenyl ether 誘導体には種々の細菌に対して抗菌作用を有するものがある事は既に知られている. 著者等は最近抗結核剤として使用されているイソニコチン酸ハイドラジットに倣い diphenyl ether を基核とする acid hydrazide 誘導体が種々の細菌に対してまた特に結核菌に如何なる抗菌作用を示すかに興味を感じ, これ等誘導体の合成に着手した. これ等 diphenyl ether-carboxylic acid hydrazide 誘導体は殆んど文献に見当らず, 今回合成した 16 種の中で文献に記載例は唯一種 (VI) のみで他は何れも新合成物質であるので, これ等につきことに報告する. 今回著者等の合成した hydrazide 誘導体を列挙すれば次の 16 種 (I)~(XVI), 即ち diphenyl ether-2-carboxylic acid hydrazide (I), diphenyl ether-3-carboxylic acid hydrazide (II), diphenyl ether-4-carboxylic acid hydrazide (III), diphenyl ether-4,4'-dicarboxylic acid hydrazide (IV), 2-methoxydiphenyl ether-5,4'-dicarboxylic acid hydrazide (V), 4-methoxydiphenyl ether-4'-carboxylic acid hydrazide (VI),

* Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto. 1) 第 6 回日本薬学会年会 (1953 年 4 月東京) に於いて発表.