を行い Fig. 2 の成績を得.

5. 熱による影響 2. の濾紙帯にビオチン 10 my を塗布し, 100° の乾燥器中で 60 分加熱後, 水飽和のブタノールを展開溶剤とし, 前述の方法により PPC, microbiological assay を行い Fig. 3 の成績を得.

6. 光による影響 2. の濾紙にビオチン 10 my を塗布し, 6 A の石英水銀燈の下 10 cm で 1 時間照射後, 前述の方法により PPC, microbiological assay を行い Fig. 3 の成績を得.

7. 酸, アルカリによる影響 ビオチン溶液 20 γ/cc, 10 cc を取り, 10 cc の $N H_2SO_4$, $N NaOH$ をそれぞれ加え, 水浴中で 85°, 60 分間加熱後ビオチン 3~5 my 相当量の溶液をマイクロピペットでそれぞれ前述 2) の濾紙帯に塗布し, 水飽和のブタノールを展開溶剤とし前述の方法で PPC, microbiological assay を行つた.

武田薬品工業株式会社研究所

Summary

Paper partition chromatography of biotin was carried out with a mixture of $AcOH : H_2O : BuOH$ (1:5:4) as the developer. Later examination by microbiological assay showed that the compound had been developed into two groups (R_f 0.6~0.7 and R_f 0.8~0.9) of substances which helped the growth of *Lactobacillus arabinosus*. Two-dimensional paper chromatography of the two components showed that the growth factor of larger R_f value changed to that of a smaller R_f value. It was observed that such phenomenon was affected by the heating and irradiation of ultraviolet light after spotting of biotin on the filter paper.

(Received December 10, 1953)

46. 田辺良久：チヤニン色素合成に関する研究 (第 19 報*)

Brooker 型色素の合成に関する追補**

Yoshihisa Tanabe: Syntheses of Cyanine Dyes. XIX. Further Note on the Synthesis of Dyes of Brooker-type Structure.

(Faculty of Pharmacy, Kanazawa University***)

第 15 報¹⁾, 第 16 報²⁾ に於いて ω -phenylaminovinyl-cycloammonium 塩 (I) を (II) 型のメゾアエリノトリメチン色素中間体に作用せしめて, 一連の Brooker 型新色素 (III) の合成に成功したことを報告した.

これに対して, アエリノ基の如き陰性基同志が反応を起し難いこと及び (I) と (II) との反応形式に今一つの可能性 (次式) のあることから, 生成された新型色素に著者が Brooker 型色素なる構造を与えることに対する疑義が投ぜられた³⁾.

* 第 18 報: 本誌 74, 98 (1954).

** 1953 年 7 月, 例会の際の質問に対する解答.

*** Tsuchitoriba Naga-machi, Kanazawa.

1) 本誌 73, 855 (1953). 2) 本誌 73, 860 (1953). 3) ** 参照.

著者は生成される色素が Brooker 型構造 (III) をとることを、その窒素、沃度の分析値及び特にその吸収極大から結論していた訳である⁴⁾。(即ち (V) 型色素が若し得られるとすれば、これは所謂 König 型色素であるが、吸収極大はこれと一致しない)。これだけの論拠で充分であると考えるが、本報文に於いては主として上記疑義に対する解答を取扱い、Brooker 型色素に間違いのないことの傍証をなさんとするものである。

(1) *meso* 位アミノ基の置換によつて色素が生成されたことに対する実験的証明 *meso* 位にメチル基を有する trimethinethiocyanine (VI) のメチル基が活性を有していることは既に知られている⁵⁾。即ち (VI) に benzaldehyde を piperidine の存在にて作用せしめるに好収量にて (VII) が得られる⁶⁾。

然るに、これと同一条件にて (VIII) の如き 2 個のメチル基をターミナルに有する trimethinethiocyanine に benzaldehyde を作用せしめた処、反応生成物 (IX), (X) を得ずに原料を回収した。

4) 本誌 73, 855 (1953).

5) 尾形：理研彙報 第 16 輯，第 8 号 592；同第 16 輯，1479.

6) 水野：1948 年 6 月，講演要旨。

このことから、メゾ位のメチル基に比してターミナルのメチル基は活性が極めて弱い、殆ど無いことが分る。この事は次の事実によつても予測される。

メチル基が窒素より数えて 3 番目, 5 番目の如き奇数番目にある (A), (C) は活性強く, 4 番目の如き偶数番目にある (B) は活性が極めて弱いことが既に知られているが, (VI) が 5 番目に活性, (VIII) が 4 番目, 6 番目で殆ど活性が無いことと一致している。

ここでターミナルに 2 個のメチル基を有し, メゾ位にアニリノ基を有する trimethinethiocyanine 中間体 (XI) を無酢と無水酢酸カリにて加熱して赤紫色を呈せしめ (XII) 型とし, その上へ ω -phenylaminovinylbenzothiazolium ethiodide (XIII) を作用せしめれば, メチル基は活性が殆ど無い故, 分析値が一致した色素が得られれば, この色素はメゾ置換体である Brooker 型色素である筈である。ここに得られた色素はハロゲンの分析値が一致することより Brooke 型色素 (XIV) で, この吸収極大は $5600 \text{ \AA}$ にしてトリメチン二核色素 (VIII) の λ_{max} $5850 \text{ \AA}$ に近い吸収をもっている。

更に (XI) に ω -phenylamino-7-methylvinylbenzothiazolium ethiodide (XV) を無酢中, 無水酢酸カリの存在で作用せしめるに (XVI) 型 Brooker 色素が得られる。この (XVI) 色素は吸収極大 $5850 \text{ \AA}$ でメゾ位に置換基をもたぬ二核色素 (VIII) の吸収と極大波形共に全く同一であることは, 先に報告した同一核を有する Brooker

型色素と全く一致すること⁷⁾より (I) と (II) より (V) 型色素 (König 型) が出来なくて (III) 型色素 (Brooker 型) が生成することが分る。

又最近 Hamer が (XVII) 型色素を合成しているが⁹⁾, この吸収極大は 5630 Å で矢張り trimethine 二核色素附近に吸収極大を有することによつても上述の事実が正しいことが想像される。

(2) 陰性基同志も反応し得ることの実験的証明 陰性基であるアニリノ基同志の反応があり得るかとの疑問に対して ω -phenylaminovinylbenzothiazolium ethiodide (XIII) に (XVIII) の如き dimethylaminoanil 体⁷⁾を無酢申炭酸カドミウムの存在で反応せしめるに既知の 1,1'-diethyl-2,2'-trimethinethiocyanine iodide (XIX) を約 90% の好収率で得た。故に当然上記反応が起り得ることの今一つの実験例を得た訳である。

又 (I) と (II) より (III) が生成する場合に反応により外れたアニリノ基の行方について検索した処, acetanilide を捕捉することを得た。

上記の Brooker 型なることの論拠として述べた分析, 吸収の 2 つの理由に加えて, 更に (1) と (2) の傍証を得て, 先に著者の得た新色素は Brooker 型以外の色素ではあり得ないことが結論される。

尙色素の構造式は共鳴構造の中の一つを便宜上記載した。

終りに臨み御助言を賜つた落合先生並びに水野教授に深謝する。

実 験 の 部

1) 1,1'-Diethyl-7,7'-dimethyl-2,2'-trimethinethiocyanine iodide (VIII) の合成 2-ethylbenzothiazole ethiodide 0.5 g, 正義酸エチルエステル 0.8 cc, 無酢 0.5 cc を 120~130° で 15 分間かきまわし乍ら加熱し, 冷後エーテル洗滌, アセトンより精製してアルコール, アセトンに紫色に溶ける緑色外観の色素 0.2 g を得。mp ca 200° (decomp), λ_{max} 5850 Å, $C_{23}H_{25}N_3I$ 計算値 I 24.42, 実験値 I 24.16。原料に使用した 2-ethylbenzothiazole ethiodide は常法により製した。白色鱗片状品, mp 192° (decomp), $C_{11}H_{14}NSI$ 計算値 I 39.98, 実験値 I 39.47。

5) 本誌 73, 855 (1953)。

6) F. M. Hamer: J. Chem. Soc. 3197 (1952)。

7) 片柳: 本誌 69, 240 (1949)。

2) 1,1'-Diethyl-7,7'-dimethyl-2,2'-trimethinethiocyanine iodide (VIII) と Benzaldehyde との反応 0.3 g の 1,1'-diethyl-7,7'-dimethyl-2,2'-trimethinethiocyanine iodide (VIII), 0.3 g の benzaldehyde, 3 cc のアルコール, piperidine 8 滴の混合を水浴上 1 時間加熱し, 冷後エーテルを加えて benzaldehyde を除き, 器底に附置した結晶を取り, アセトンより精製するに 0.18 g の色素を得. この色素は mp 195° (decomp), 緑色外観にして λ_{max} 5850 Å で原料そのものであつた. 回収率約 60%. $C_{23}H_{25}N_3S_2I$ 計算値 I 24.42, 実験値 I 24.59.

3) 1,1'-Diethyl-7,7'-dimethyl-meso-anilino-2,2'-trimethylenethiocyanine 1,1'-dichloride $\cdot$ 3 HCl (XI) の合成 thiocarbonyltetrachloride 1 g をリグロイン 10 cc に溶かし, その上より炭酸ソーダ溶液 (0.55 g+23 cc) 8 cc を加え, 振盪し乍らそれにアニリン 0.4 g を加え, 15 分間振盪し, リグロイン層を分離し塩化カルシウムにて乾燥. このリグロイン液を 2-ethylbenzothiazole ethiodide 2.6 g と炭酸カドミウム 1 g との混合に加え, かきまぜ乍ら水浴上で約 15 分間加熱するに褐色樹脂状物を生ず. リグロインを傾瀉し, 樹脂状物をメタノールより抽出, 脱色炭を用いて精製し粗中間体 1.55 g を得. 更に再結晶して mp 240~243° (decomp) 外観白色の結晶を得. $C_{29}H_{34}N_3S_2Cl_5$ 計算値 Cl 26.67, 実験値 Cl 26.23.

4) 1,1',1''-Triethyl-7,7'-dimethyl-meso-(2''-benzothiazolyl)-vinyl-2,2'-trimethinethiocyanine 1,1'-diiodide (XIV) の合成 1,1'-diethyl-7,7'-dimethyl-meso-anilino-2,2'-trimethylenethiocyanine 1,1'-dichloride $\cdot$ 3 HCl (XI) 0.5 g に無酢 1 cc, 無水酢酸カリ 0.5 g を混合し, 120~130° にて少時加熱するに赤紫色を帯びる. その上へ ω -phenylaminovinylbenzothiazolium ethiodide (XIII) 0.25 g を加え, 同温度で 15 分間かきまぜ乍ら反応せしめるに紫色外観の色素を生ず. 冷後エーテルにて洗滌, 水洗, 乾燥して"うぐいす"色外観の粗色素 0.4 g を得. アニリン, エーテルより精製し, 更にアセトリンより再結晶するに mp 230~235° (decomp), λ_{max} 5600 Å. $C_{34}H_{35}N_3S_2I_2$ 計算値 I 30.40, 実験値 I 30.62.

5) 1,1',1''-Triethyl-7,7',7'''-triethyl-meso-(2''-benzothiazolyl)-vinyl-2,2'-trimethinethiocyanine 1,1'-diiodide (XVI) の合成 1,1'-diethyl-7,7'-dimethyl-meso-anilino-2,2'-trimethylenethiocyanine 1,1'-dichloride $\cdot$ 3 HCl (XI) 0.4 g を無酢 0.5 cc, 無水酢酸カリ 0.4 g と 120~130° にて加熱し, 着色するに至り, 次に 7-methyl-2-phenylaminovinylbenzothiazolium ethiodide (XV) 0.2 g を加え, 同温で 15 分間加熱反応せしめ, 冷後エーテル洗滌, アニリンに溶しエーテルにて析出せしめ, 粗色素 0.4 g を得. アセトンより精製, 紫黒色外観の色素を得. λ_{max} 5850 Å. $C_{35}H_{37}N_3S_2I_2$ 計算値 I 29.78, 実験値 I 29.90. 原料に使用した 7-methyl-2-phenylaminovinylbenzothiazolium ethiodide (XV) は正義酸エステル, アニリン, 2-ethylbenzothiazole ethiodide より尾形法により製した. 橙黄色結晶, mp 207° (decomp). $C_{15}H_{19}N_2SI$ 計算値 I 30.10, 実験値 I 29.97.

6) 2-Phenylaminovinylbenzothiazolium ethiodide (XIII) と benzothiazole-2-aldehyde-*p*-dimethylaminoanil ethiodide (XVIII) の反応より得られる 1,1'-diethyl-2,2'-trimethinethiocyanine iodide の合成 2-phenylaminovinylbenzothiazolium ethiodide 0.2 g, dimethylaminoanil 体 (XVIII) 0.2 g, 炭酸カドミウム 0.4 g, 無酢酸 2 cc の混合を 120~130° にて 15 分間加熱し, 冷後エーテル洗滌, アニリン, エーテルより精製, 色素 0.24 g を得 (約 90%). アセトンより精製し mp 265° (decomp), λ_{max} 5600 Å. $C_{21}H_{21}N_3S_2I$ 計算値 I 25.78, 実験値 I 25.81. benzothiazole-2-aldehyde-*p*-dimethylaminoanil ethiodide (XVIII) は本誌 69, 240 記載の片柳法による. mp 236° (decomp). $C_{18}H_{20}N_3SI$ 計算値 I 29.06, 実験値 I 28.65.

7) Brooker 型色素生成の際の aniline の行方 1,1'-diethyl-meso-anilino-4,4'-trimethylenequinocyanine 1,1'-diiodide $\cdot$ 2 HCl 2.0 g, 4-phenylaminovinylquinolinium ethiodide 1.0 g, 無酢 4 cc, 無水酢酸カリ 1.0 g の混合を 120~130° で 15 分間, かきまぜ乍ら反応せしめるに青色々素 (Broker 型) を生ず. 冷後エーテル洗滌した洗液を集め, エーテルを留去, 水中に投じ無酢を分解し, 再びエーテルにて抽出し, エーテルを留去し更に減圧で酢酸を留去するに約 0.32 g の粗 acetanilide を得. 水より再結晶して mp 113°. 分子量 120.5 (Rast), acetanilide と混融して融点降下を認めず. C_8H_9NO 計算値 C 71.11, H 6.66, N 10.37, 実験値 C 70.64, H 6.59, N 10.28.

金沢大学薬学部

Summary

Syntheses of the Brooker-type dyes were reported in Part XV and XVI of this series, but some counter-argument has been made against the conclusion of the Brooker-type structure because of the difficulty of the mutual reaction of negative anilino groups and the possibility of another substitution in this synthetic method. The conclusion of the Brooker-type dyes was made from the analytical values and absorption spectra but further proof of the formation of a Brooker-type dye by the substitution of an anilino group

in the *meso*-position was afforded by the application of ω -phenylaminovinylbenzothiazolium ethiodide or ω -phenylamino-7-methylbenzothiazolium ethiodide on binuclear trimethinethiocyanine dye possessing inactive methyl in the terminal group and anilino group in the *meso*-position, to a Brooker-type thiocyanine with a terminal methyl, whose absorption spectrum was similar to or the same as that of binuclear trimethine dyes. It was also experimentally proved that reaction of negative anilino groups does occur by the fact that 1,1'-diethyl-2,2'-trimethinethiocyanine iodide was obtained from ω -phenylaminovinylbenzothiazolium ethiodide and benzothiazole-2-aldehyde *p*-dimethylaminoanil ethiodide.

(Received December 10, 1953)

47. 鈴木友二, 萩原武美雄, 高木康史: 蛇毒蛋白の研究 (第1報)

蛇毒の電気泳動並びに酵素作用について

Tomoji Suzuki, Fumio Hagihara, and Yasushi Takagi: Studies on Snake Venom. I.

Paper Electrophoresis of Snake Venoms and Their Enzyme Activities.

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

台湾コブラ, 台湾ハブ, 蝮蛇など台湾産及び本邦産の 11 種の蛇毒について, 沝紙微量電気泳動法を応用し蛇毒蛋白の電気的性質について検討した。又台湾コブラ 毒については, 有毒蛋白部分並びに酵素活性をもつ蛋白部分の化学的分離を行い, 毒作用と酵素作用との関係についても検討した。

蛇毒の電気泳動 蛋白の沝紙微量電気泳動法は従来方法¹⁾によるときは, 良好な結果を得にくかつたが,²⁾ 著者らは Kunkel, Tiselius の装置を用い, 沝紙をはさむ硝子板に珪素樹脂を焼きつけ, 更に沝紙を重ねて用いることによつて良好な結果をえた (Fig. 1, Fig. 2 参照)。この方法で比較的簡単に蛋白の分離ができ, かつ満足すべき結果を得ることを知つたので, これを以下の蛇毒の研究に応用した。

Fig. 1. Paper Electropherograms of Human Serum and Snake Venomes (Barbital Buffer pH: 8.6, μ : 0.1)

Fig. 2. Paper Electrophoretic Pattern of Normal Human Serum

台湾コブラ *Naja naja atra* Cantor (I), 泰国産コブラ *Naja naja naja* (II), キングコブラ *Naja hanah* (III), 雨傘蛇 *Bungarus multicinctus* Blyth (IV), 鎖蛇 *Vipera russellii formosensis* Maki (V), 台湾ハブ *Trimeresurus mucrosquamatus* Cantor (VI), 青ハブ *Trimeresurus gramineus stjnegeri* Schmidt (VII), ハブ

* Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

1) E. L. Durrum: J. Am. Chem. Soc. 72, 2943 (1950).

2) 鈴木, 前川: 本誌 71, 1298 (1951).