U.D.C. 612.398.196 : 547.583.5

89. 萩原武美雄, 岡崎雄交: アントラニル酸の代謝産物 Anthraniloyl-anthranilic Acid の単離

Fumio Hagihara and Yuko Okazaki: Isolation of Anthraniloylanthranilic Acid as the Metabolic Products of Anthranilic Acid.

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

From the urine of a rabbit administered with 1 g./kg. weight of anthranilic acid, unchanged acid and bimolar-bonded acid, anthraniloylanthranilic acid, were isolated and confirmed. This detoxication mechanism is a kind of peptide bonding but a peptide bonding of two moles of anthranilic acid is a new observation. Formation of anthraniloylanthranilic acid in rabbits is very marked but the amount formed is very small in rats, indicating a difference between animals. Apart from the above, 5-hydroxyanthranilic acid, *o*-aminohippuric acid, and bound anthranilic acid, different from the existing metabolites, were detected by paper chromatography.

(Received December 16, 1955)

アントラニル酸 (A酸) はトリプトファンからの代謝産物であることが、微生物でも高等動物でも認められており、またこの物質は肝臓中の催乳因子でもある。従来、動物に A酸を投与した場合¹⁾、A酸のグルクロニド²⁾の他、*o*-uramidobenzoic acid, 5-hydroxyanthranilic acid^{3, 4)} などが排泄されることが知られている。またリボフラビン欠乏動物にトリプトファンを与えると、A酸及び上記代謝産物の量が著明に増すことも報告されている⁵⁾。

著者等は今回 A酸 (I) を与えた家兎の尿から anthraniloylanthranilic acid (AA酸) (II) を単離同定し、A酸の可成りの量が生体内で AA 酸に変化することを知った。

Fig. 1.
Paper Chromatograms of Metabolic Products of Anthranilic Acid

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

1) R. T. Williams: "Detoxication Mechanism," London, 105(1949).

2) H. G. Bray, H. J. Lake, F. C. Neale, W. V. Thope, P. B. Wood: Biochem. J. (London) **42**, 434(1948).

3) 古武, 古武: 大阪医, **41**, 1028(1942).

4) 白井: 生化学 **22**, 223(1950).

5) M. Mason: J. Biol. Chem. **201**, 513(1953).

先にのべた従来のA酸の代謝産物からもわかるように, A酸の生体内変化の形式としては, 今までグリシン抱合, グルクロン酸抱合, 酸化など一般解毒の方式だけが認められていたのであるが, 今回の著者らの知見は, 外から与えた薬物同志のペプチド結合による解毒と考えられ, その点興味深く感じた。

またラッテにA酸を与えて, その代謝産物をペーパー・クロマトグラフィーでしらべ, 家兎の場合と比較した。その結果は Fig. 1 に示す通りで, ラッテではA酸グルクロニドと考えられる物質の排泄が圧倒的に多く, また 5-hydroxyanthranilic acid の生成も顕著に認められるが, A A酸の排泄はわずかししか認められず, その点家兎の場合と様子を異にする。家兎ではA A酸の生成は顕著に認められるが, A酸グルクロニド, 5-hydroxyanthranilic acid の生成量はラッテ程著しくない。

なおペーパー・クロマトグラフィーでは *o*-アミノ馬尿酸と考えられるスポット及び従来のいずれの代謝産物にも相当しない結合型のA酸のスポットをも認めているが, これらについては更に精査したいと思う。

終りに臨み, 終始御指導を賜わった京都大学薬学科鈴木友二教授に深謝する。

実 験 の 部

Anthranilic acid の純度試験 A酸はフタルイミドを原料として作るので, 市販のA酸にはA A酸が不純物として混在する懸念もある。そのため実験に用いたA酸をペーパー・クロマトグラフィーで試験したところ, 一つのスポットを与えた。また市販の酸を減圧昇華し水から再結晶した純結晶を家兎に与えた動物試験も行つた。

Anthraniloylanthranilic acid の単離 A酸 2~3 g を炭酸ナトリウムで中和した後水で全量 15cc とし, 2 回に分けて健康家兎 (体重 2~3 kg) の背部皮下に注射 (体重 1 kg 当り 1 g) し, 24 時間尿を少量の酢酸を入れた容器に採集。家兎 2 匹に 4 日間A酸を与え, ここに得た約 2 L の尿を酢酸酸性とし, これに少量の酢酸銅の飽和水溶液を加えると, やや多量の沈澱を生ずる。暫時室温に放置後沈澱を濾取, 充分水洗。沈澱を少量の水に懸濁, 硫化水素を通じて銅塩を分解。分解液にエタノールを加えて加温抽出, 黒褐色の液を得。沈澱は再びエタノールと煮沸, 抽出を 2 回繰り返す。抽出液を合し, 減圧下に濃縮し, 黒褐色シロップ状の物質を得, この抽出物をベンゼン各 50 cc ずつを用いて 3 回煮沸抽出, ベンゼンを留去, 淡褐色結晶状残留物を得。この結晶を再びベンゼン 50 cc で抽出し, ベンゼン抽出液は後の操作に廻し, 残留物を少量のエタノールから再結晶。mp 201~203° の褐色プリズム晶約 20 mg を得。この結晶にはなお微量のA酸が混在するので 110° で減圧昇華してA酸を除き, さらに 170° で減圧昇華し, mp 204° の無色プリズム晶約 10 mg を得た。上のベンゼン抽出液はさらに 10 cc まで濃縮, 褐色針状結晶 mp 128~133° 約 1.4 g を得。この粗結晶を 3 mmHg, 110~115° で減圧昇華, mp 145° のA酸の純結晶約 1.2 g を得。減圧昇華した残渣をエタノール, さらに含水ジオキサンから再結晶, mp 203° の淡褐色結晶約 30 mg を得。

mp 204° のプリズム晶は, 170° 附近で既に一部昇華する。Ehrlich の *p*-dimethylaminobenzaldehyde 試薬によつて橙色, 過クロル鉄試薬によつて褐色, HNO₂ によつて一過的に黄色, ジアゾ化した後, 津田試薬 (β -diethylaminoethyl- α -naphthylamine) をカップリングさせると水に不溶性の紫色色素を生ずる。水には殆んど溶けず, ベンゼンには比較的難溶, エタノール, ジオキサンには易溶, 希硫酸, 希アルカリに易溶。紫外線を照射すると紫色螢光を発し, そのナトリウム塩水溶液について紫外部吸収スペクトルは 265 m μ , 310 m μ に吸収極大を示し, A酸とは明らかに異なる物質である (Fig. 2,).

Fig. 2.
Ultraviolet Spectra of Anthranilic Acid and Its
Metabolic Product

ここに得た物質はA A酸と考えられ, これについて各種溶媒系に対する Rf 値及び濾紙電気泳動法の泳動値を

求めた結果, 合成した A A 酸の値とよく一致した (Table I).

Table I. Migration Distances and Rf Values of Anthranilic Acid and Its Metabolic Products

	Ionophoresis*	Paper chromatography			
		BuOH : NH ₄ OH (10 N)	Benzene : AcOH : H ₂ O	CHCl ₃ : AcOH : H ₂ O	
	(cm.)	(5 : 1)	(2 : 2 : 1)**	(2 : 2 : 1)***	
Anthranilic acid	5.3	0.31	0.92	0.95	
Anthraniloylanthranilic acid	0.7	0.57	0.92	0.95	
Isolated substance (mp 204°)	0.7	0.57	0.92	0.95	
5-Hydroxyanthranilic acid	2.5	0.06 (decomp)	0.00	0.30	

* 500 V, 0.4 mA/cm., Duration : 3 hrs., Buffer : M/60 Phosphate buffer pH 7.0

** 4 hrs. at 30°

*** 6 hrs. at 30°

次に結晶 1 mg を 5 N HCl, 或いは 5 N NaOH と封管中で 100°, 20 時間加熱加水分解. 酸分解液は減圧で濃縮乾固, HCl を除いてから, 水 0.2 cc に溶かして沝紙電気泳動用の試料とした. また NaOH 分解液は HCl を加えて中和後乾固し, エタノール抽出して塩類を除き, これを試料として, ペーパー・クロマトグラフィー及び沝紙電気泳動法を行つた所, 加水分解によつて A A 酸に相当するスポットは消失し, 新たに A 酸に相当するスポットのみが現われた (Fig. 3).

Fig. 3.
Ionophoresis of Anthraniloylanthranilic Acid

また合成した A A 酸と単離した結晶とを混融した所, 融点の降下なく, 合成品及び尿から分離した結晶について, 紫外部吸収スペクトル, 呈色反応, 各種溶媒に対する Rf 値, 泳動値など比較したが, いずれもよく一致することを認め, 尿から単離した結晶は anthraniloylanthranilic acid であることを確認した.

以上の結果から今回単離した結晶は A 酸の結合型で, A 酸 2 分子が脱水結合した anthraniloylanthranilic acid である. 元素分析の結果も理論値によく一致する. C₁₄H₁₂N₂O₃. 計算値 C 65.62, H 4.72, N 10.93, 分子量 256.3, 実験値 C 65.50, H 4.80, N 10.79.

今回単離した A A 酸が分離操作の途中で 2 次的に生成した人工産物ではないことを明らかにするため, 未処理の尿に就きペーパー・クロマトグラフィー, 沝紙電気泳動法を行い, 上と同様の結果を得, 明らかに家兎体内で変化したものであることを認めた.

Anthraniloylanthranilic acid の合成 フタルイミド 0.1 M を 2 N NaOH 50 cc に溶かした液を -3° に冷却, これに 2 N NaOH 120 cc に計算量の塩素を通じて生成した次亜塩素酸ナトリウム 0.1 M, NaOH 0.02 M の混液を少量ずつ振りまぜながら加える. 80% の NaOCl 液を加えると, 反応液の温度は約 20° に上昇, 液は赤褐色となる. 残りの NaOCl 液を一度に加えると, 液温は 45~50° に上昇, 暗赤色となり, まもなく白色の針状品が析出. これを暫く放置後沸騰水浴上に注意して加熱, 盛んに CO₂ を発生して縮合. 約 1 時間加熱して反応を完結後, 氷水で充分冷却, A A 酸を Na 塩として析出. 吸引沝過, 沈澱は少量の冷水で洗滌, 不純物を除く. 水に溶かし, 酢酸を加えて酸性とし A A 酸を析出沈澱. 沝過水洗, 希エタノールから再結晶. 収量 4.2 g, mp 204°, C₁₄H₁₂N₂O₃, 計算値 C 65.62, H 4.72, 実験値 C 65.86, H 4.56.

5-Hydroxyanthranilic acid の合成 m-hydroxybenzoic acid に benzenediazonium chloride をカップリングさせて製した 4-hydroxy-2-carboxyazobenzene をアルカリ性で Na₂S₂O₃ で還元して合成した. mp 231°.

ペーパー・クロマトグラフィー, 沝紙電気泳動法 ペーパー・クロマトグラフィーは Table I に掲げた溶媒を用い, 上昇法で行つた. 沝紙電気泳動法は鈴木, 前川の方法⁷⁾によつた. スポットの検出は紫外線を照射して発する蛍光を観察し, また Ehrlich の aldehyde 試薬を噴霧して呈色せしめて行つた.

ラッテに於ける実験 家兎の場合と同様, ナトリウム塩として皮下に注射した (体重 100 g 当り 0.1 g).

京都大学医学部薬学科