ロール化合物) 0.3 g を得.

Ethyl 3,5-dimethyl-2-pyrrolidinecarboxylate (VII, R=methyl) (VI) (R=methyl) 1 g をエタノール 10 cc に溶かし酸化白金 50 mg を触媒として接触還元. 水素を定量的に吸収, 溶媒を留去後蒸留, bp₂₃ 105° の留分 0.8 g を得. C₉H₁₇O₂N 計算値 C 63.13, H 10.00, N 8.18, 実験値 C 62.94, H 10.09, N 8.00.

Ethyl 2-nitro-4-acetylvalerate (X) 3-dimethylaminomethyl-2-butanone (IX)²²⁾ 12.9 g (0.1 mol) を石油エーテル 50 cc に溶かしこれに ethyl nitroacetate 13.3 g (0.1 mol) を滴加. 直ちに油層が器底に生成し多少の発熱が認められた. 3日間室温に放置後反応物にエーテルを加え 10% 塩酸で振った. 有機溶媒層を水洗乾燥後蒸留, 目的物 17.3 g (80%) を得. bp₃ 130°. C₉H₁₅O₅N 計算値 C 49.76, H 6.96, N 6.45, 実験値 C 50.06, H 7.09, N 6.31.

Ethyl 4,5-dimethylpyrrolidine-2-carboxylate (XI) 上記 (X) 10.9 g (0.05 mol) を無水エタノール 70 cc 中ラネーニッケル 5 g を触媒として 40 気圧, 32° で約 2 時間還元. 反応物を常法で処理し塩基性部分から目的物 7.3 g (86%) を得. bp₃ 81°, n_D²⁰ 1.4485. (VI) (R=methyl 及び isopropyl) 同様の特有のアミン臭を有し臭素を直ちに脱色し, 過マンガン酸カリウムを直ちに脱色せず暫時後に脱色. Zerewitinoff 法活性水素定量 (3 回平均) から本品は Δ¹-形 82%, Δ²-形 18%, picrolonate: mp 140° の黄色針状晶. C₁₀H₂₃O₂N₂ 計算値 C 52.65, H 5.35, N 16.16, 実験値 C 52.87, H 5.47, N 16.38. 上記還元の際中性部分から松材反応陽性の部分 (ピロール化合物) を得.

武田薬品工業株式会社研究所

22) Hagemeyer, Jr.: J. Am. Chem. Soc. **71**, 1119(1949).

U. D. C. 547.466.2 : 546.56-86

141. 石館守三, 花木 昭: N-Bis(2-chloroethyl)amino Acid 金属キレート化合物について

Morizo Ishidate and Akira Hanaki: On the Metal Chelate Compounds of N-bis(2-chloroethyl)amino Acids.

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

The metal chelating ability of N-bis(2-chloroethyl)-glycine and -alanine, which are cytotoxic agents, was studied comparing with that of N-bis(2-hydroxyethyl)glycine, sarcosine, and glycine. N-Bis(2-chloroethyl)-glycine and -alanine form chelate compounds only with copper and their stability constants were estimated as log k_1 4.90, 4.30 and log k_2 3.30, 3.02 respectively, i.e. far weaker than that of the other amino acids compared. The chlorine-liberating velocity of the chelate compound was of the same order as that of the free amino acid. These results suggest that the copper chelates of N-bis(2-chloroethyl)amino acids are unstable and transform easily under hydrolysis to the more stable N-bis(2-hydroxyethyl)amino acid chelates.

(Received February 14, 1957)

グリシン及びアラニンのアミノ基の二つの水素を 2-chloroethyl 基に置換した N-bis(2-chloroethyl)amino acid は, 著者の一人石館及び桜井, 泉¹⁾によつて合成され腫瘍細胞に対し興味ある新化合物であることが報告された. なかんずく, アラニンの誘導体は bis(2-chloroethyl)methylamine (HN₂) より作用係数 (最少有効量/50% 致死量) は極めて大で制癌剤として有望のものであつた, しかし水溶液においては極めて不安定で, 速かにクロールイオンを放出し, その作用は一過性の欠点を有するように見えた.

そこで今回これらのアミノ酸誘導体の両性イオンとしての性状と, また一般にアミノ酸が銅その他の重金属類と比較的安定なキレート化合物を生成する性状に着目し, これらの N-bis(2-chloroethyl)amino acid について Cu を初め Ni, Zn, Co, Cd 各イオンのキレート生成能ならびにそれらの安定度を検討した. 同時に比較のた

* Motofuji-cho, Bunkyo-ku, Tokyo.

1) M. Ishidate, Y. Sakurai, M. Izumi: J. Am. Pharm. Assoc. **44**, 133(1955); M. Izumi: Pharm. Bull. (Japan) **2**, 275(1954).

(4.90, 4.30), $\log K_2(3.30, 3.02)$ は比較的小さく, 他のアミノ酸例えばグリシン, N-methylglycine または N-bis(2-hydroxyethyl)glycine (後出) のキレート化合物より遙かに不安定なものである. 従つて水溶液中では (1) の反応は容易に進み, しかも不可逆的に進行するから (VIII), (IX) のキレートは遂に完全に崩潰することになる. この際 (2) の反応の進行によつて生ずる N-bis(2-hydroxyethyl)amino acid (VI または VII) は存在する金属イオン (例えば Cu^{2+}) と N-bis(2-chloroethyl)amino acid より安定なキレートを生成するのでこれが (VIII), (IX) のキレートの分解を促進することになる. またこの際 pH の増加は更に (I) の反応速度を増大し, 同じく (VIII), (IX) のキレートを不安定とする. 従つて Cu より更にキレート生成能の弱い Ni, Zn, Co, Cd は N-bis(2-chloroethyl)amino acid ではキレートの安定化と生成が更に困難である理由が理解できる.

Table I. Ionization Constants of N-Bis(2-chloroethyl)amino acid

$$t = 25.0 \pm 0.5^\circ \quad \mu^* = 0.10 \quad \gamma_{\text{H}^+}^{+***}) = 0.80$$

Substance	pK_2
N-Bis(2-chloroethyl)glycine	6.24
N-Bis(2-chloroethyl)alanine	6.15
N-Bis(2-chloroethyl)alanine amide	3.46

* ionic strength ** activity coefficient

Table II. Stability Constants (K_1 , K_2) of N-Bis(2-chloroethyl)amino acid Cu Chelates

Substance	$\log K_1$	$\log K_2^*$	$\log K_1/K_2$	X^{**}
N-Bis(2-chloroethyl)glycine	4.90	3.30	1.60	3.16
N-Bis(2-chloroethyl)alanine	4.30	3.02	1.28	2.19

$$t = 25.0 \pm 0.5^\circ \quad \mu = 0.10 \quad \gamma_{\text{H}^+} = 0.80$$

* Extrapolated value from formation curve

** Spreading factor $K_1/K_2 = 4X^2$

Fig. 1.
Titration Curves of N-Bis(2-chloroethyl)glycine
in the Presence and Absence of Cu^{2+} ion in
0.1 M KCl at $25.0 \pm 0.5^\circ$
A : free 0.002 M amino acid
B : same as A with 0.001 M Cu^{2+}

Table II または滴定曲線 Fig. 1 より理解されるように N-bis(2-chloroethyl)glycine の Cu キレートの spreading factor は N-bis(2-hydroxyethyl)glycine のそれ (Table V, Fig. III) に比して小さくキレート (VIII) より (IX) への移行は連続的に行われるものと考えられる.

なお N-bis(2-chloroethyl)glycine-Cu キレートは水に難溶性であるために 2-クロルのイオン化速度を正確に

Fig. 2.
Cl-liberation Curves of N-Bis(2-chloroethyl)glycine
and its Cu Chelate in 0.01 M Acetate
Buffer at $37.0 \pm 0.5^\circ$
A : free 0.002 M amino acid
B : 0.001 M Cu chelate

測定することは困難であるが, 同一条件 (pH, 温度) で N-bis(2-chloroethyl)glycine と比較した結果を Fig. 2 に示す.

N-Methylglycine (Sarcosine) グリシンのアミノ基に一個のメチル基を導入すると pK_2 は僅かに増大する (Table III). もし金属キレートにおいて金属イオンの親和力がプロトン親和力に並行するものであれば同一金属の場合は配位子 (ligand) の pK が大なるほどキレート安定度は増大するはずである. 実際はこの通例があてはまらぬことが N-methylglycine において見られた (Table III).

Table III. Stability Constants of Glycine and N-Methylglycine Metal Chelates

	N-Methylglycine				Glycine ⁵⁾	
	log K_1	log K_2	log K_2	X	log K_1	log K_2
Cu	7.75	6.44	1.31	2.27	8.62	0.87
Ni	5.52	4.33	1.20	2.00	6.18	0.66
Zn ⁶⁾	4.80	3.52	1.28	2.19	5.52	0.72
Co	4.52	3.40	1.12	1.82	5.23	0.71
Cd ⁷⁾	4.08	3.14*				

$$t = 25.0 \pm 0.5^\circ \quad \mu = 0.10 \quad \gamma_{H^+} = 0.80$$

$$\text{glycine: } pK_1 = 2.23^5) \quad pK_2 = 9.78^5)$$

$$\text{N-methylglycine: } pK_1 = 2.21 \quad pK_2 = 10.04$$

* Extrapolated value

N-Acetylglycine 及び N-Benzoylglycine グリシンのアミノ基をアシル化した両化合物は, 何れの金属ともキレート生成能を示さなかつた. これは当然予想されるようにアシル化による N 原子のプロトン及び金属イオンへの親和性の減退によると解される. 両化合物の測定された第一の解離定数 (pK) は Table IV の如くであつた.

Table IV. Ionization Constants of N-acetyl- and N-benzoyl glycine

Substance	pK_1
N-Acetylglycine	3.52
N-benzoylglycine	3.58

$$t = 25.0 \pm 0.5^\circ \quad \mu = 0.10 \quad \gamma_{H^+} = 0.80$$

N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine この化合物の金属キレートに関しては既に Martell 等⁷⁾ の報文がある. 同氏等が指摘しているように, この化合物の解離定数 pK_2 が母体であるグリシンに比して低い値をもっているにもかかわらず金属キレートの安定度はグリシンの場合にほぼ等しい (Table V).

Fig. 3.
Titration Curves of N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine
in the Presence of various Metal Ions in
0.10 M KCl at $25.0 \pm 0.5^\circ$
0.001 M amino acid with 0.001 M of A: Cu^{2+}
B: Ni^{2+} C: Zn^{2+} D: Co^{2+} E: Cd^{2+}

今配位子と金属イオンを 1:1 の割合に加えた場合のアルカリによる滴定曲線 (Fig. 3) からキレート生成の状態を推定してみる. このような条件でグリシンの場合には滴定の進行に伴なつて生成された 1:1 のキレートが 2:1 (配位子:金属) のキレートに移行しここに解離した金属イオンは水酸化物となつて沈澱したが N-bis(2-hydroxyethyl)glycine ではこのような現象は見られなかつた. この事実はキレート (1:1) は N 原子とカルボ

5) C. B. Monk: Trans. Faraday Soc. 47, 297(1951); $t = 25^\circ$, $\mu = 0$.

6) D. J. Perkins: Biochem. J. 51, 487(1952); $pK_2 = 10.22$, $t = 20.0^\circ$ $\log k_1 k_2$: Zn 8.8, Cd 7.5.

7) A. E. Martell, et al.: J. Am. Chem. Soc. 75, 2185(1953).

キシル基の O 原子以外に hydroxyethyl 基の一個の OH 基にも配位して structure I の構成を持ち、アルカリの添加によつても直ちに金属の解離が生起せず、中間にキレート分子自身が水酸化物として生成されることが推定される。この仮定の下に、各金属のキレートの加水分解定数を算出すれば Table VI となる。

Ni, Zn, Co, Cd キレートではキレート加水分解定数を金属イオンの加水分解を無視して計算するとそれらの値はアルカリの添加に伴なつて低下することが見られる。更にアルカリを添加すれば沈澱を生ずる。これはこれ

Titration Curves of N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine
in the Presence of various Metal Ions in
0.10 M KCl at $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$
0.002 M amino acid with 0.002 M
A: Cu^{2+} B: Ni^{2+} C: Zn^{2+} D: Co^{2+} E: Cd^{2+}
F free 0.002 M amino acid

らの金属イオンの配位力が弱いキレートの解離が起り金属水酸化物になる傾向を指示するものであろう。

配位子と金属イオンを 2:1 の割合に加えた場合の滴定曲線を Fig. 4 に示す。これによると Cu, Zn の如く一般に配位数 4 として取り扱われているキレートでは spreading factor が他に比べて大きい。この事実は前述の如く N-bis(2-hydroxyethyl)glycine が三配位能を有すると考えれば配位数 4 の金属では第二の配位子が入り得る軌道は唯一つよりなく、あえて 2:1 のキレート (structure II) を形成するにはキレート (structure I) の最も弱い β 位の OH 基による配位結合が解離してから第二の配位子と結合することになると説明される。即ち結合の自由エネルギーに対応する安定度の低下が見られるわけである。

Table V. Stability Constants of N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine Metal Chelates

Metal	$\log K_1$	$\log K_2$	$\log K_1/K_2$	X
Cu	8.27	5.46	2.81	12.4
Ni	6.33	4.44	1.89	4.41
Zn	5.32	3.30	2.02	5.12
Co	5.26	3.51	1.75	3.75
Cd	4.86	3.50	1.36	2.40
$pK_2^7=8.27$ $t=25.0 \pm 0.5^\circ$ $\mu=0.10$ $\gamma_{H^+}=0.80$				

Table VI. Hydrolysis Constants of N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine Metal Chelates (Structure I)

Metal	pK_H^*	pK_{Hm}^{**}
Cu	7.02	6.8
Ni	9.8	9.4
Zn	8.7	8.7

7) A. Martell: $pK_2=8.08$, $t=30^\circ\text{C}$ $\mu=0.1$, $\gamma_{H^+}=0.78$.

Co	9.1	8.9
Cd	9.9	

* Hydrolysis Constant

** Metal hydrolysis constant obtained from Martell's report⁸⁾

$$t = 25.0 \pm 0.5^\circ \quad \mu = 0.10 \quad \gamma_{H^+} = 0.80$$

計算式 安定度: 金属キレートは一般に

の如く段階的に生成されるものとする。然る時安定度は Albert⁹⁾ の式によつて

$$K_1 = \frac{\bar{n}}{(1-\bar{n})[L^-]} \quad \bar{n} < 1 \quad K_2 = \frac{\bar{n}-1}{(2-\bar{n})[L^-]} \quad \bar{n} > 1$$

の如く与えられる。上式で $[L^-]$ は解離状態にある配位子の濃度, $\bar{n}$ は金属イオン一個に対して結合している配位子の平均数を表わし, それぞれ次の如く表わされる。

$$\log[L^-] = \log\{Cl - [B] - [H^+] + [OH^-] + [A]\} - \log[H^+]/k_2\{1 + 2[H^+]/k_1k_2\}$$

$$\bar{n} = \{Cl - \alpha[L^-]\}/C_M \quad \alpha = 1 + [H^+]/k_2 + [H^+]^2/k_1k_2$$

上式で $[B]$, $[A]$ は添加したアルカリ, 酸の濃度を表わす。

安定度が低くキレート生成に際して沈澱が生じ易い場合には Bjerrum の式¹⁰⁾。

$$K = K_1K_2 = 1/[L^-]^2 \quad \bar{n} = 1$$

によつて全安定度を計算する。

2) 金属キレート加水分解定数: 金属キレート $M^+L(H_2O)$ が

の如く加水分解する場合には

$$Cl = [M^+L(H_2O)] + [ML(OH)] + [L^-]$$

$$[B] - Cl + [H^+] - [OH^-] = [ML(OH)] + Cl$$

なる関係が成立する。簡単のため

なる反応が右方へ進行し難い状態のみについて $[L^-]$ が無視でき

$$pK_H = pH + \log\{Cl - \{[B] - Cl + [H^+] - [OH^-]\}\} / \{[KOH] - Cl + [H^+] - [OH^-]\}$$

なる関係が導かれる。

実験の部

pH 滴定 $5.00 \times 10^{-2} M$ 金属塩化物 (Zn のみは硫酸塩) 2~4 cc, $1.00 \times 10^{-1} M$ キレート剤 2~4 cc 及び $0.1 M$ 塩化カリ 10 cc を正確にビーカーに秤取し, これに CO_2 を除いた蒸留水を加えて全量を約 100 cc とする。マグネチックスターラーで攪拌しながら窒素気流中で $0.1 M$ KOH (可及的に脱 CO_2 する) で滴定し pH を測定する。中和に要する滴定液 (KOH) の半量を滴下した場合に全量が正確に 100 cc となるように予じめ調整しておく。この点において金属濃度は $1.00 \sim 2.00 \times 10^{-3} M$, キレート剤は $2.00 \sim 4.00 \times 10^{-3} M$, となる。滴定時の温度は $25.0 \pm 0.5^\circ$ で N-bis(2-chloroethyl)amino acid は不安定のため滴定の都度必要量を秤定した。

クロールイオン放出の測定 500 cc メスフラスコに $0.1 M$ 酢酸緩衝液 (pH 4.7) 50 cc 及び蒸留水を加え N-bis(2-chloroethyl)glycine に対して等 mol の NaOH (10 cc) を加え $37 \pm 0.5^\circ$ 恒温槽に浸して平衡に達せしめる。これに N-bis(2-chloroethyl)glycine (236.5 mg) 及びその Cu キレート (230.5 mg) を加え全量を 500 cc にし 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 時間後に一定量を秤取しクロールイオン濃度を定量する。

クロールイオンの分析¹¹⁾: 一定量の検液に 0.3% チオシアン酸水銀エタノール溶液 2.5 cc, 6% 鉄明バン- 6% 硝酸溶液 25 cc を加え全量 $25 cc$ として 10 分後 460 m μ の吸光度を測定し, 検量曲線より濃度を求めた。

N-Bis(2-chloroethyl)amino acid Cu キレート 製法: 蒸留水 10 cc に硫酸銅 1.0 g を溶かし, これに N-bis(2-chloroethyl)amino acid HCl 1.0 g を加えて急速に $1 M$ NaOH を滴下し攪拌する。pH 約 3.5 で生じた沈澱を急速に濾取し蒸留水及びエタノールで充分洗浄し減圧乾燥する。

8) A. E. Martell et al.: J. Am. Chem. Soc. **74**, 5057(1952).

9) A. Albert: Biochem. J. **47**, 531(1950); **50**, 690(1952).

10) Bjerrum: "Metal Ammine Formation in Aqueous Solution" (1941).

Cu の分析：約 100 mg のキレートを経秤し濃硝酸 0.5 cc を加え、赤外ランプで 100~110° で加熱殆んど乾固せしめ、更に同量の濃硝酸で同一処理を行う。固化物に 0.5 M アンモニア水 20 cc を加えて溶かし蒸留水で 100 cc にしてその 10~20 cc をとり 0.5 M アンモニア水 1 cc 及び蒸留水 50 cc を加えて 0.01 M EDTA で滴定する¹²⁾。

N-bis(2-chloroethyl)glycine Cu	13.2% (calculated 13.8%)
N-bis(2-chloroethyl)alanine Cu	12.6% (calculated 12.9%)

Cl の分析：約 100 mg のキレートを経秤し、5% NaOH 2 cc を加えて赤外ランプで 1 時間加熱乾固せしめ、更に 5% NaOH 1 cc を加えて同一操作を行う。固化物に蒸留水を加えて不溶分を汙別更に洗浄し汙液を合せて 100 cc とする。この一定量をとつて Cl の分析を行った。

N-bis(2-chloroethyl)glycine Cu	31.3% (calculated 30.7%)
N-bis(2-chloroethyl)alanine Cu	29.3% (calculated 28.8%)

東京大学医学部薬学科

11) 内海：日化 52, 835(1952).

12) G. Schwarzenbach: "Die Komplextometrische Titration" (1955).

U. D. C. 547.853.7*569.3 : 577.164.111

142. 川崎 式, 米本春生: シオール型 Thiamine 誘導体について その 9 Thiamine Benzyl Disulfide の酸化成績体について (Vitamin B₁ 及び 諸関係化合物の研究 第 87 報*)

**Hazime Kawasaki and Haruo Yonemoto: Studies on Vitamin B₁ and Related Compounds LXXXVII*. Thiol-Type Thiamine Derivatives. (9).
Oxidation Product of Thiamine Benzyl Disulfide.**

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd**.)

Alkaline hydrolysis of the oxidation product (II) of thiamine benzyl disulfide (I) affords thiamine (III) and phenylmethanesulfinic acid (IV), which would suggest that the structure of (II) should be represented as (A). Hydrolysis in acetic acidity results in the formation of thiamine (III), benzyl phenylmethanesulfonothiolate*** (XI), and dibenzyl disulfide (XII).

Refluxing of (II) in ethanol affords thiamine disulfide, thiamine benzyl disulfide and dibenzyl disulfide, while the same reaction in isobutanol gives thiamine disulfide, thiamine benzyl disulfide, thiochrome, and dibenzyl disulfide. Further heating however causes disappearance of thiamine disulfide and thiamine benzyl disulfide and formation of thiochrome, thiothiamine and (XI) is observed.

Oxidation of (II) with hydrogen peroxide failed to show the formation of sulfonothiolate*** (XIV).

(Received February 18, 1957)

さきに川崎は thiamine alkyl disulfide 類を酢酸溶液中過酸化水素, あるいはクロロホルム中過安息香酸で酸化し, 反応液からそれ等の酸化成績体と考えられる物質を paper partition chromatography (以下 PPC と略す) によつて検出した。これ等のうち thiamine benzyl disulfide (I) の酸化成績体は結晶状に分離せられ, 元素分析値から (I) の monosulfoxide であることを知つたり。今回の酸化成績体の性状, 構造等について検討し若干の知見を得た。

disulfide (I) の酸化成績体 (II) としては (A) または (B) の構造が推定されるがこれを合成的に証明するこ

* 本研究は松川泰三: Vitamin 及び諸関係化合物の研究 (Taizo Matsukawa: Studies on Vitamin B₁ and Related Compounds.) の一部である。第 86 報, 本誌, 77, 264 (1957).

** Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

*** IUPAC 規則 30 のチオカルボン酸の命名法を拡張して適用した。

1) 川崎: 本誌 76, 706(1956).