UDC 547.861'853 : 577.164

311. 朝日 豊：薬品のポーラログラフ的研究 (第15報*) プテリジン類の
ポーラログラフイー (v) アミノプテリン, プテロ酸,
10-ホルミル葉酸, アメトプテリン

Yutaka Asahi: Polarographic Studies of Pharmaceuticals. XV. Polarography
of Pteridine Derivatives. (v). Aminopterin, Pteric Acid,
10-Formylpteroylglutamic Acid, and A-methopterin.

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

Aminopterin (I), pteric acid (II), 10-formylpteroylglutamic acid (III), and A-methopterin (IV), which have structure similar to that of pteroylglutamic acid (V), show three-step reduction waves in acid and 1~2 step reduction waves in alkaline state like (V). The first wave is a two electron-two proton reduction wave to dihydropteridine and this wave is split into two steps in (II) and (III) by dissociation of the hydroxyl. The second wave is due to reductive cleavage of $-\text{CH}_2-\text{N}=\text{}$ in 6-position and the third wave is due to reduction from 6-methyl-dihydropteridine to tetrahydropteridines. $E_{1/2}$ of the first wave is similar in all these compounds and the value at pH 7 is around -0.72 to -0.76 V. $E_{1/2}$ of the second wave at pH 4 is -0.88 (V) and -0.98 V (I, III, IV) and its wave height is the highest at around pH 4. Aminopterin shows post wave due to adsorption phenomenon.

(Received May 1, 1959)

さきに葉酸のポーラログラフ的研究を行ないその電極反応を明らかにした¹⁾。本報では葉酸 (Ie) とよく似た構造をもち生化学的にも関連が深いアミノプテリン (Ia), プテロ酸 (Ib), 10-ホルミル葉酸 (Ic), アメトプテリン (Id) などのポーラログラフ的性質について述べる。これらはいずれも葉酸に近似しアルカリ性では1段, 酸性では3段の還元波を示す (Fig. 1)。その電極反応を比較検討した結果葉酸と同様に説明できることを知り葉酸の電極反応を確かめることができた。 $E_{1/2}$ と pH との関係および拡散電流恒数 k_D は Table I, Fig. 2 にまとめて示され, 電極反応はつぎのように要約される。

Fig. 1.
Polarograms of Aminopterin (a), Pteric Acid (b),
10-Formylpteroylglutamic Acid (c), and
A-methopterin (d).
(0.1 mM), pH 4.6 (a~d), 8.0 (a').

実験結果

Aminopterin i) ポーラログラフイー。アミノプテリンはアルカリ性で1段, 酸性で2~3段の還元波を示す。その第1波は pH 1~13 で $E_{1/2} = -0.33 - 0.06 \text{ pH}$ で表わされる $E_{1/2}$ をもち, $E_{1/4} - E_{3/4} = 30 \text{ mV}$ で pH 2~13 における拡散電流恒数 k_D は $2.46 (\mu\text{A mM}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ sec}^{1/2})$ を示し, 2電子2プロトン還元波とみなされる。pH 6~10 でこの還元波の一部が約 0.1 V 陰電位にずれる。この全波高は濃度および Hg 圧の平方根に比例し (Table

* 第14報: 本誌 79, 1565(1959).

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

1) 朝日: 本誌, 79, 1548(1959).

Fig. 2.

 $E_{1/2}$ -pH Curves of Some Pteridine Derivatives

- Aminopterin (a),
 - - - + - - - Pterotic Acid (b).
 —○— 10-Formyl-PGA (c),
 —△— A-methopterin (d).
 —×— Pteroylglutamic Acid (e).
 I~VII assignment (see text)

Table I. Summarized Polarographic Data of Pteroylglutamic Acid (e), Aminopterin (a), Pterotic Acid (b), 10-Formyl-PGA (c), A-methopterin (d), and 2-Amino-4-hydroxy-6-methylpteridine (f). Gl: Glutamic Acid

$E_{1/2} = E_0 - a \cdot \text{pH}$ (mV vs. N. C. E.); k_D : $\mu\text{A mM}^{-1} \text{ mg.}^{-1/2} \text{ sec.}^{1/2}$; * $\text{pH} \approx 4$

No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	(I) → (II)			(II) → (III) (IV)			(III) → (V)			(VII) → (II)		
					E_0 (mV)	a	k_D	E_0 (mV)	a	k_D^{*1}	E_0 (mV)	a	k_D^{*1}	E_0 (mV)	a	k_D
e	NH ₂	OH	φCOGl	H	-300	64	2.4	-520	90	2.4	-930	60	3.0	310	60	
a	NH ₂	NH ₂	φCOGl	H	-330	60	2.46	-660	80	1.23	-980	60	(3.0)			
b	NH ₂	OH	φCOOH	H	-340	60	2.64	-590	80	2.64						
c	NH ₂	NH ₂	φCOGl	CHO	-290	60	2.3	-640	83	1.5	-930	60	3.0	330	60	-2.0
d	H	NH ₂	φCOGl	CH ₃	-280	64	(1.6)	-640	83							
f	NH ₂	OH			-250	70	3.15	—	—	—	-930	64	3.0	270	60	-2.5

Fig. 3.

Electro-capillary Curves of Borate Buffer (pH 8.3) alone (—○—) and with 0.1 mM Aminopterin (---x---)

Table II. Effect of Characteristics of Electrode on Total Wave-height (i_a : μA) and Absorption Wave-height (i_a : μA) of Aminopterin
0.1 mM in pH 8.32

$m=0.607, t=4.66, m\% t\%=0.926, h=77.8$ $\Delta q=0.85 m\% t^{-1/2}=0.37, i_a/\Delta q=0.1$					$m=7.15, t=3.02, m\% t\%=4.41, h=58.9$ $\Delta q=2.0, i_a/\Delta q=0.1$				
h (cm.)	i_a (μA)	$i_a h^{-1} \times 10^4$	i_a (μA)	$i_a h^{-1/2} \times 10^2$	h (cm.)	i_a (μA)	$i_a h^{-1} \times 10^3$	i_a (μA)	$i_a h^{-1/2} \times 10^2$
87.8	0.044	5.01	0.236	2.56	78.9	0.24	3.04	1.14	1.28
77.8	0.036	4.69	0.216	2.45	68.9	0.22	3.19	1.06	1.28
67.8	0.032	4.72	0.208	2.53	58.9	0.20	3.40	1.02	1.33
57.8	0.024	4.15	0.188	2.47	48.9	0.14	2.87	0.88	1.26
	av. 4.65		av. 2.50		38.9	0.12	3.08	0.80	1.22
						av. 3.12		av. 1.27	

II) 拡散電流の性質を示すが、後者の波高は電極表面積の増加速度 ($\Delta q=0.85 m\% t^{-1/2}$) および Hg 圧に比例し 0.1 mM 以上で濃度に比例せず、吸着波の性質をもつ。またこの異常波は 0.01% セラチンの存在によつて消失する。さらに pH 8.3 ホウ酸塩緩衝溶液の毛管電位曲線はアミノプテリン 0.1 mM の存在で著しく変化し、-1 V 以上で Hg の界面張力の低下が認められた (Fig. 3)。これらの性質からこの異常波はアミノプテリンがジヒドロ体よりも電極に吸着され易いために起ると考えられる。この吸着波高から吸着分子が電極界面で占める面積を Brdicka²⁾ にしたがつて計算すると約 300 Å² を得る。この値は Van der Waals 半径を用いて見積られた分子の最大断面積約 200 Å² より大きいので比較的ゆるくつまつた単分子層をつくると思われる。

酸性で認められるアミノプテリンの第 2 波は $E_{1/2}=-0.66-0.08$ pH で表わされ葉酸より約 0.1 V 陰電位である。その波高は pH 4 付近が最大であるが葉酸より低く第 1 波の約半分である。第 3 波は水素波に近いので不明瞭であるが葉酸¹⁾、2-amino-4-hydroxy-6-methyldihydropteridine³⁾ の還元波に近い。

ii) 定電位電解。1 mM アミノプテリンの pH 6.1 緩衝溶液 0.5 cc を第 2 波の電位 -1.3 V vs NCE で電解、4 電子還元に必要な 0.193 coulomb を通じると電解電流がほとんど 0 になる。電解液は第 1, 2 波を示さず 2,4-diamino-6-methyldihydropteridine (IIIa) によると思われる還元波 (pH 6.1, 8.2 でそれぞれ $E_{1/2} -1.35, -1.48$ V, k_D 3.0) および陽極波 (pH 13 で $E_{1/2} -0.26, i -0.25 \mu A/0.1$ mM) が認められる。計算量の *p*-aminobenzoyleglutamic acid (IVa) がジアゾ法⁴⁾ で検出された。

Pteric acid 本物質は葉酸によく似た還元波を示す。第 1 波は pH 2~10 で $E_{1/2}=-0.34-0.06$ pH, $E_{1/4}-E_{3/4}=30$ mV, k_D 2.64 を示し、2 電子 2 プロトン還元波とみなされる。第 2 波は pH 2~7 で認められ $E_{1/2}=-0.59-0.08$ pH を示し、その k_D は pH 4 付近で 2.64 を示すが pH によつて変化する。このほか酸性で葉酸に類似の第 3 波を示す。

10-Formylpteroyleglutamic acid i) ポーラログラフィー。本物質も葉酸に類似の還元波を示す。その第 1 波は $E_{1/2}=-0.29-0.06$ pH (pH 1~10), k_D 2.3 を示し、強アルカリ性では $E_{1/2}$ が少し陰電位にずれる。第 2 波は葉酸のそれより約 0.1 V 陰電位で $E_{1/2}=-0.64-0.083$ pH で表わされる。その波高は pH 1~5 で k_D 1.5 を示し、pH >5 では pH の上昇とともに低下する。pH 4 付近で認められる第 3 波は葉酸のそれに一致し $E_{1/2}=-0.93-0.06$ pH で表わされる。

ii) 第 1 波の電位における電解。1 mM の 10-ホルミル葉酸の pH 6.1 緩衝溶液 0.5 cc を -1 V で電解し、2 電子還元に必要な 0.096 coulomb を通じると、第 1 波がなくなり第 2 波 ($E_{1/2} -1.17, k_D$ 1.7) 第 3 波 ($E_{1/2} -1.29, k_D$ 1.2) が増大する。また pH 13 ではジヒドロプテリジンに起因する陽極波 ($E_{1/2} -0.23, i -0.1 \mu A/0.05-0.1$ mM) を示す。これを空気酸化すると約 50% がもとの 10-ホルミル葉酸にかえり、一方 2-amino-4-hydroxypteridine-6-carboxaldehyde ($E_{1/2} -0.95$) が現われる。後者は dinitrophenylhydrazone として確かめられた。電解液はジアゾ反応陰性であるが空気酸化、HCl 加水分解後は陽性になる。

iii) 第 2 波の電位における電解。2 mM の 10-ホルミル葉酸の pH 6.1 緩衝溶液 0.5 cc を -1.20~-1.25 V で約 4 時間電解し、4 電子還元に必要な 0.39 coulomb を通じると第 1, 2 波がほとんどみられなくなり第 3 波 ($E_{1/2} -1.3, k_D$ 2) が明瞭になる。電解液は 2-amino-4-hydroxy-6-methyldihydropteridine (IIIb) に一致するポーラログラムを示す。

iv) 第 3 波の電位における電解。(iii) と同じ溶液を -1.3 V で電解すると還元波が減少し (Vb) に相当する酸化波 (pH 6.2, 9.2, 13 でそれぞれ $E_{1/2} -0.08, -0.25, -0.5$) があらわれる。

10-Formyltetrahydropteroyleglutamic acid leucovorin を 0.5N HNO₃ で 25°, 2 時間処理しアルカリ性にしたと定量的に 10-ホルミル-テトラヒドロ葉酸 (VIIb) が生成する。(VIIb) は $E_{1/2}=+0.33-0.06$ pH, $E_{1/4}-E_{3/4}=35$ mV, $k_D -2.0$ の恒数をもつ 1 段の酸化波を示す。これは 2 電子 2 プロトン酸化波とみなされる。

2) R. Brdicka: Z. Elektrochem. 48, 721, 278, 686(1942).

3) 朝日: 本誌 79, 1554(1959).

4) A. C. Bratton, E. K. Marshall, Jr.: J. Biol. Chem. 128, 539(1939).

A-methopterin 本物質はアルカリ性で 1 段、酸性で 3 段の還元波を示す。その第 1 波は pH 1~12 で $E_{1/2} = -0.28 - 0.064 \text{ pH}$, $E_{1/4} - E_{3/4} = 30 \text{ mV}$ を示し、その波高は pH 4~12 で一定である。pH 4 付近では第 2, 3 波が認められる。強酸性では第 2 波が減少し第 1 波が増大し、たとえば 0.1N HCl あるいは H_2SO_4 中では第 1 波のみが認められる。

考 察

上述の 4 種の葉酸同族体は葉酸によく似たポーログラムを示し葉酸と同様に説明される。まず第 1 波の拡散電流恒数 k_D は葉酸のそれに近く、 $\Delta E_{1/2}/\Delta \text{pH}$ は -59 mV に近い。またアミノプテリシ (Ia), 10-ホルミル葉酸 (Ic) を第 1 波の電位で電解すると 2 電子をとりジヒドロ体 (II) になる。したがって第 1 波は (I) から (II) への 2 電子 2 プロトン還元波と考えられる。pH 7 における $E_{1/2}$ は $-0.72 \sim -0.76 \text{ V}$ の範囲にあり、c, d, e, a, b の順であるが混合物では全く区別できない。なお (Ic) の第 1 波の $E_{1/2}$ は葉酸と同じく強アルカリ性で陰電位にずれるが、(Ia), (Id) はかような現象を示さない。これは 4 位の OH の解離によつて還元され難くなるためである。

酸性における第 2 波の電位で (Ia), (Ic) を電解すると計 4 電子をとり 6-methyldihydropteridine (III) およびアミン (IV) になる。また第 2 波は pH 4 付近で最も高く pH の上昇につれて低下し、 $\Delta E_{1/2}/\Delta \text{pH}$ は $-80 \sim -90 \text{ mV}$ である。そこで第 2 波の電極反応はジヒドロプテリジン (II) のプロトン付加体が非可逆的 2 電子 2 プロトン還元を受け 6 位の $-\text{CH}_2\text{NH}<$ 基が切れる反応と解せられる。なお葉酸 (e) およびプテロ酸 (b) の第 2 波の $E_{1/2}$ は他の a, c, d よりも約 0.1 V 陽電位にあるので、これによつて葉酸の分離定量が可能である。

酸性における第 3 波の $E_{1/2}$ はさきに報告した 2-amino-4-hydroxy-6-methyldihydropteridine (IIIb) のそれに近く、この電位で電解すると tetrahydro 体 (V) が得られる。そこで第 3 波は (III) から (V) への 2 電子 2 プロトン還元波とみなされる。第 3 波の高さは第 2 波と同じく pH および前放電者によつて変化する。これは (IIIb) について詳論したように電極界面におけるプロトン付加体の濃度が電極界面におけるプロトン濃度およびプロトン付加反応速度に関係するためである。強酸性で第 1 波が増大し第 2 波が減少するのは葉酸と同じく (I) のプロトン付加体が一挙に 4 電子還元を受け (III) および (IV) になるためと考えられる。

従来 10-ホルミル葉酸 (c) は葉酸と同等の活性があり、プテロ酸 (b) は高等動物や *L. Casei* には不活性であるが *S. Faecalis* には活性を示すといわれている。またアミノプテリン (a) およびアメトプテリン (d) は citrovorum factor (CF) の拮抗物質で、(a) の作用は CF では回復するが葉酸では回復しないことが知られている。これらはいずれも葉酸に近い還元電位をもつことから生体内でも同様に還元されると思われる。たとえば (c) は 10-ホルミルテトラヒドロ葉酸を経て容易にロイコポリンになり CF 活性を示すと解せられる。

武田薬品工業株式会社研究所