UDC 615.779.932-011

320. 人見 弘：アミンによるペニシリンの分解に関する研究(第6報*) N-置換アニリン
およびアルキルアミンによるベンジルペニシリンの水溶液中における分解

Hiromu Hitomi: Studies on Decomposition of Penicillin with Amines. VI.

Decomposition of Aqueous Solution of Benzylpenicillin by
N-Substituted Anilines and Alkylamines.

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

Decomposition of benzylpenicillin in aqueous solution with N-substituted aniline or alkylamine results in the formation of benzylpenicilloic acid, N-formyl-d-penicillamine, and benzylpenillic acid. Benzylisopenilloic acid is formed by the application of N-disubstituted anilines and alkylamines. Some considerations were made on the relationship between the yield of benzylpenillic acid and pKa' value, and the mode of decomposition of procaine benzylpenicillin.

(Received July 11, 1959)

第2報¹⁾, 第5報²⁾でアニリンおよび核置換アニリンによるベンジルペニシリンの水溶液中における分解, 第3報³⁾でベンジルアミンおよびその誘導体による分野について報告したが, 本報では種々のN-置換アニリンおよびアルキルアミンによる分解を検討した。

本報で使用したN-置換アニリンはN-methylaniline, N-ethylaniline, N,N-dimethylaniline, N,N-dimethyl-o-toluidine, N,N-dimethyl-m-toluidine, N,N-diethylaniline, N,N-diethyl-o-toluidine, N,N-diethyl-m-toluidine, N,N-diethyl-p-toluidine, アルキルアミンはbenzylamine, phenethylamine, ethylenediamine, cyclohexylamine, ethylamine, diethylamine, 2-diethylaminoethyl benzoate, 2-diethylaminoethanol, triethylamine, N,N-dimethylbenzylamine および caffeine である。

分解方法は前報に準じた。すなわちベンジルペニシリン(I)・カリウム塩水溶液(1 m mol)に上記アミン塩酸塩の当量を加え, N-置換アニリンの場合はpH 5.5, アルキルアミンの場合はpH 6.5に補正して37°の恒温室に放置する。N,N-dimethyl-m-toluidine および N,N-diethyl-p-toluidine ではこの濃度で白濁し, 旋光度測定が困難なため0.5 m molの溶液を用いた。その間24時間ごとに旋光度, pH および抗菌力(ヨウ素滴定法⁴⁾)を測定するとともにbenzylpenillic acid(II)の収率を調べたが, その結果はFig. 1に示すとおりである。benzylpenillic acidの収率はN-置換アニリンでは48~72時間, アルキルアミンでは24時間で最高に達し, その後は減少する。

分解液は減圧下に濃縮し, N-モノ置換体および一級, 二級アルキルアミンの場合はpH 2.0で酢酸エチル抽出し, 炭酸水素ナトリウムで処理して中性部と酸性部にわけた。中性部はphenaceturic acidの当該amide体(VIa, b)である。アルキルアミンではbenzylamineとphenethylamineの場合にのみamide体(VIc, d)が得られた。酸性部は再び酸性で酢酸エチルで抽出すると淡黄色粉末が得られる。この組成を調べるために第4報のpaper partition chromatographyを行ないbenzylpenicilloic acid(III), N-formylpenicillamine(V), benzylpenilloic acid(IV)の他にRf 0.72にspotを得た。このspotはアンモニウム性硝酸銀およびりんモリブデン酸で冷時呈色することからSH基をもつ化合物と推定される。ただしN-methylaniline, N-ethylaniline, カフェインの場合はこのspotは認められない。ペニシリン分解物中SH基をもつ既知の化合物にはd-penicillamine(VII), N-formyl-d-penicillamine(V), benzylpenamaldic acid(VIII), benzylisopenillic acid(IX), benzylpenillamine(X), benzylpenicillenic acid(XII)およびbenzylisopenilloic acid(XI)がある。これら化合物のうちd-penicillamine, benzylpenillamine, benzylisopenillic acidはpH 2.0で酢酸エチルに抽出されず,

* 第5報: 本誌 79, 1606(1959).

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

1) 人見: 本誌 74, 185(1954).

2) 本誌 79, 1606(1959).

3) 人見: 本誌 74, 188(1954).

4) J. F. Alicino: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 18, 619(1946).

Fig. 1. Decomposition Curve of Aqueous Solution of Benzylpenicillin by N-Substituted Aniline and Alkylamine

N-formyl-d-penicillamine とは Rf 値がことなり, benzylpenamaldic acid は不安定で水溶液中においてのみその存在が知られているにすぎず, また benzylpenicillenic acid は上記 paper partition chromatography では spot が得られないことから benzylisopenilloic acid の可能性が考えられるが, 本化合物は benzylpenilloic acid のアルコール溶液を加熱すると生成するが⁵⁾, その諸性質については記載されていない. そこで Rf 0.72 の

5) H. T. Clarke, J. R. Johnson, S. R. Robinson: "The Chemistry of Penicillin" (1949). p. 541.

Fig. 2.

Ultraviolet Absorption Spectra of
Benzylpenilloic acid (in MeOH)

化合物を粉末沓紙による column partition chromatography で固定相に pH 6.0 の 20% phosphate buffer, 移動相に水飽和ブタノールを用い, りんモリブデン酸反応陽性の区分から淡黄色粉末を得た. 本品は上記 paper partition chromatography で Rf 0.72 に 1 個の spot が得られることから単一な化合物と推定される. りんモリブデン酸反応, 塩化鉄反応ともに陽性で紫外外部吸収スペクトルは Fig. 2 に示すとおりである. 本化合物を 50% エタノールにとかし 30 分間水浴上で加熱後 paper partition chromatography で調べたところ, アンモニア性硝酸銀で Rf 0.64 と 0.72, りんモリブデン酸で 0.72 に spot が得られる. Rf 0.64 の spot は benzylpenilloic acid のそれであることから benzylpenilloic acid を生成することがわかった. また 50% エタノール中 pH 2.0(HCl) で 4 時間煮沸後ブタノール・エタノール・水 (4:1:1) で上昇法による paper partition chromatography を行い, ニンヒドリンで Rf 0.19 に spot を得た. この spot はメチルアミン塩酸塩 (XIII) の spot と全く一致する. また常法による paper partition chromatography ではりんモリブデン酸で Rf 0.30, 0.72, アンモニア性硝酸銀で Rf 0.30, 0.64, 0.72 に spot が得られる. 以上の事実から構造は XI 式すなわち benzylisopenilloic acid であることが確定した. この化合物の収率は N-ジ置換体ではきわめて少ないが, アルキルアミンでは 8.6% の収率で得られた.

Fig. 3.

Relation between Benzylpenillic
Acid Yield and pK_a of Amine.

さて benzylpenillic acid の収率は N-置換アニリンではかなりことなるがアルキルアミンの場合はいずれも 54% の高収率を示す. そこでこれらアミンの pK'_a 値と benzylpenillic acid の収率との関係に, さらにアニリンおよびその同族体の pK'_a 値と収率との関係をまとめると Fig. 3 が得られる. Fig. 3 から例外はあるが, 1) 核置換アニリンでは pK'_a 値が大きくなる程収率は低下し 4.5 付近で約 10% となり, 2) N-置換アニリンでは pK'_a 値が大きくなる程収率も増加し, 7 付近で 54% となり, 3) アルキルアミンでは pK'_a 値が大きくなつても収率は 54% 以上にならない. 4) カフェインのように pK'_a 値がきわめて小さい化合物では 48% の高収率を示している. これら個々の場合について考察をこころみた. すなわち 1) の場合すでに前報で詳述したように非解離すなわち分子状のアミンが benzylpenillic acid の生成に関係しこれが多い程, すなわち pK'_a 値が小さい程収率が高い. アニリンの場合はこれら核置換アニリンの場合と比較して収率がとくに高いのは非解離アニリンの関係している度合がとくに大なるためと考えられる. 2) の場合はつぎのように水溶液中でプロトンの付加した N-置換アニリン $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}^+\text{H}(\text{R})$ がペニシリンの 4 位の窒素またはラクタムのカルボニルに水素結合してこの部分の分解を容易ならしめ, pK'_a 値が増大するにしたがつてこのイオンが増加するから酸の生成量が増すと考えられる. 3) の場合 pK'_a 値が大きくなつても収率が増加しないのはこの水素結合をおこす限度があるためと考えら

れる。du Vigneaud 等⁶⁾は benzylpenillic acid の生成機構としてまずプロトンがペニシリンの 4 位の窒素に結合してラクタム環を開裂させるとしている。この推論は著者の説を支持するものと考えられる。4) の場合は 1) の場合と同様に考えられる。

最後にベンジルペニシリン・プロカイン塩ではプロカインの pK'_a 値が大きいが、benzylpenillic acid の収率は第 4 報で述べたように 47.7% で、アルキルアミン類の場合よりやや低い。これは 1) 2-diethylaminoethyl benzoate および 2-diethylaminoethanol では 54% の収率を示していることから diethylamino 基よりむしろ *p*-位のアミノ基が benzylpenillic acid の生成に関与していると考えられる。2) 2-diethylaminoethyl benzoate および 2-diethylaminoethanol による分解のさいは benzylisopenilloic acid を生成するが、プロカインの場合には生成しない。これらのことからプロカイン塩の分解様式は本報のアミンとは本質的にことなり、むしろ核置換アニリンによる分解と同じ系列であり、*p*-位のアミノ基が benzylpenillic acid の生成に関与していると考えられる。

以上の結果から 1) benzylpenicilloic acid, benzylpenilloic acid, N-formyl-*d*-penicillamine 及び benzylpenillic acid はいずれの場合にも共通に得られる。2) benzylpenillic acid の収率は N-置換アニリンでは pK'_a 値が大きくなる程増加するが、アルキルアミンでは 54% の高収率で得られる。3) benzylisopenilloic acid は N-モノ置換体では生成しないが、N-ジ置換体では若干生成し、アルキルアミンの場合は 8.6% の収率で得られる。カフェインでは生成しない。4) phenaceturamide 体は N-モノ置換体、benzylamine, phenethylamine の場合にのみ得られることがわかった。さらに benzylpenillic acid の収率と pK'_a 値との関係およびベンジルペニシリン・プロカイン塩の分解様式について言及した。

第 4 報から第 6 報までの研究にさいし、本研究の機会を与えられ終始御鞭撻を賜わり本文の御校閲を賜わった研究所長桑田 智博士ならびに第二部長立岡末雄博士に謹謝する。またペニシリンを供与された当社大阪工場第五課課長日下網治博士に御礼申し上げる。さらに理化学的測定を担当された神尾、島、仲町の諸氏、元素分析の労をとられた分析室の諸氏に感謝する。なお実験に協力された今西正彦氏に謝意を表する。

実 験 の 部

Benzylisopenilloic acid ベンジルペニシリン K 塩 7.44 g と N,N-dimethyl-*o*-toluidine 塩酸塩 5.5 g を蒸留水 2 L にとかし、pH 5.5 に補正して 37° の恒温室に 72 時間放置後、減圧下に約 200 cc になるまで濃縮し、pH 2.0 で AcOEt 各 40 cc で 3 回抽出、抽出液を合して水洗、乾燥後減圧下に濃縮乾固して淡黄色粉末 3 g を得。これから column partition chromatography (CPC) で benzylisopenilloic acid の単離を試みに行なつた。すなわち粉末濾紙 200 g を pH 6.0 の 20% phosphate buffer 80 cc とよく混合し内径 4.5 cm のガラス管に充填し、これに上記 AcOEt 抽出物 1 g の水飽和 BuOH 溶液を注加し、同じ溶媒で展開し、最初のりんモリブデン酸反応陽性の区分を集め、NaHCO₃ 水溶液に転溶、これを pH 2.0 で AcOEt 抽出し、水洗、脱水後減圧下に乾固すると淡黄色粉末が得られる。収量 0.1 g 種々結晶化を試みたが不成功であつた。本品 50 mg を 50% EtOH 15 cc にとかし 30 分間煮沸する。冷却後減圧下に濃縮乾固して得られる飴状物を pH 6.0 の 5% phosphate buffer・BuOH による PPC で調べた結果 benzylpenilloic acid の spot を認めた。また本品 50 mg を 50% EtOH 15 cc にとかし 0.1N HCl で pH 2.0 にして 4 時間煮沸、冷却後減圧下に濃縮し、水を加えて AcOEt で抽出し、この抽出液を上記と同様に PPC で調べた結果 N-formyl-*d*-penicillamine, benzylpenilloic acid および benzylisopenilloic acid を認めた。また酢酸エチル抽出液を BuOH・EtOH・H₂O (4:1:1) による PPC に付し、ニンヒドリンで Rf 0.19 に spot を認めた。この spot は CH₃NH₂・HCl の spot と全く一致した。

既知の方法で造つた benzylpenilloic acid 100 mg を 50% EtOH 30 cc にとかし 30 分間煮沸後減圧下に濃縮し PPC で benzylisopenilloic acid の生成を認めた。

Phenaceturic acid phenethylamide (N-Phenethyl-2-(2-phenylacetamido)acetamide) phenethylamine による分解液を pH 2.0 で AcOEt で抽出し、酸性化化合物を NaHCO₃ で除去し、AcOEt 層を水洗、脱水後減圧下に乾固する。得られる粗結晶を dil EtOH から再結晶すると白色結晶、mp 141~144° となる。C₁₈H₂₀O₂N₂ 計算値 C 72.95, H 6.80, N 9.45. 実験値 C 73.06, H 6.95, N 9.17.

Phenaceturic acid N-methylanilide (N-methyl-2-(2-phenylacetamido)acetanilide) N-methylaniline による分解液から得られる中性化合物を dil MeOH から再結晶すると白色結晶、mp 91~93° が得られる。C₁₇H₁₈O₂N₂ 計算値 C 72.32, H 6.43, N 9.92. 実験値 C 72.46, H 6.59, N 10.04.

Phenaceturic acid N-ethylanilide (N-ethyl-2-(2-phenylacetamido)acetanilide) N-ethylaniline による分解液から得られる中性化合物を dil MeOH から再結晶すると、mp 151~153° が得られる。C₁₈H₂₀O₂N₂ 計算値 C 72.95, H 6.80, N 9.45. 実験値 C 73.13, H 6.73, N 9.23. 武田薬品工業株式会社研究所

6) F. H. Carpenter, R. A. Tunner, V. du Vigneaud: J. Biol. Chem. 176, 893(1948).