N-置換誘導体の合成 Table I 及び Table II.

Table II.

R ₁	R ₂	Starting material	Acetone (cc.)	Pyridine (g.)	Reagent	React. time (hrs.)	Yield (g.)	Recrystd. from
CH ₃ CO	H	(V) 12 g.	100	3	(CH ₃ CO) ₂ O 5 g.	3 (boil)	7	C ₂ H ₅ OH CH ₃ COCH ₃
C ₂ H ₅ CO	H	(V) Na salt 5 g.	100	3	C ₂ H ₅ COC1 2 g.	3 (boil)	3.8	C ₂ H ₅ OH
C ₆ H ₅ CO	H	(V) Na salt 10 g.	150	3.8	C ₆ H ₅ COC1 4.5 g.	5 (boil)	8.6	CH ₃ OH CH ₃ COCH ₃
CH ₃	H	(V) Na salt 8 g.	100	6	CH ₃ I 5.4 g.	6 (boil)	3.5	C ₂ H ₅ OH
C ₆ H ₅ CH ₂	H	(V) Na salt 7.5 g.	100	5.7	C ₆ H ₅ CH ₂ Cl 4.6 g.	10 (boil)	5	C ₂ H ₅ OH
C ₆ H ₅ CO	C ₆ H ₅ CO	(V) Na salt 5 g.	50	3.8	C ₆ H ₅ COC1 3.4 g.	3 (boil)	1.8	C ₂ H ₅ OH
CH ₂ CON<CH ₃ CH ₃	H	(V) Na salt 3.1 g.	100	1	BrCH ₂ CON(CH ₃) ₂ 2 g.	10 (boil)	3.0	C ₂ H ₅ OH H ₂ O

日本新薬株式会社研究所

UDC 577.164.11+546.14.266

笠原 関： ビタミン B₁ に対するプロムシアンの作用 (第2報*)ビタミン B₁ モノ塩に対するプロムシアンの作用

Shizuka Kasahara: Action of Cyanogen Bromide on Thiamine. II.

Action of Cyanogen Bromide on Mono-salts of Thiamine.

(National Hygienic Laboratory, Osaka Branch**)

Application of cyanogen bromide to the aqueous solution (pH 6.0~7.0) of thiamine monohydrochloride (I') or mononitrate (I'') at 10~20° results in the formation of thiochrome, cyanothiamine, and hydrogen bromide, as well as hydrochloric acid from (I') and nitric acid from (I''). Four days after the reaction, the amount of thiochrome and cyanothiamine formed became about 10% of the thiamine present before the reaction. The pH of the solution falls rapidly to around 5.0 immediately after the reaction but the fall becomes gradual thereafter, and finally reaches pH 3.42 in (I') and pH 3.62 in (I''). The free acid formed in the reaction mixture becomes about one mole for thiamine present before the reaction.

(Received December 25, 1958)

thiamine は水溶液中でアンモニウム型 (I), カルビノール型 (II), チオール型 (III) の3型をとり互いに平衡状態にあつて酸性では (I) にアルカリ性では (III) に片寄つていと報告されている。また著者は第1報で (III) のナトリウム塩にプロムシアン (以下 BrCN と略) を作用させると好収量で cyanothiamine (V) が生成することを報告した。thiamine monochloride (I') あるいは thiamine mononitrate (I'') に BrCN を作用させて生成する物質から thiamine の水溶液中の態度を考察する目的で本実験を行なつた。

* 第1報：本誌 77, 1133(1951).

** Hoensaka-cho, Higashi-ku, Osaka.

1) 松川, 岩津, 万木：本誌 71, 369(1951); 松川, 万木：本誌 72, 1599(1952); 渡辺, 朝日：本誌 75, 1050(1955).

(I') あるいは (I'') の水溶液に BrCN を室温 (10~20°) で作用させると液は黄緑色に着色し螢光を発するようになる。2 日間放置未反応の BrCN をエーテルで除いた後反応液をイソブタノールで抽出し、この抽出液を減圧濃縮、水酸化ナトリウムアルカリ性として thiamine anhydride²⁾ (VI) および thiochrome (IV) を捕捉した。反応液を薄紙クロマトグラフィー (以下 PPC と略) (酢酸・ブタノール・水 (1:4:5) 下降法) でしらべると (VI) は全く認められず Rf 0.52 に (V) のスポットを検出したのみであつた。(V) は (IV) との分離が困難で結晶化することができなかつたので水酸化ナトリウムでアルカリ性としたため生成した (V) が (VI) に変化したと考えられる。すなわち (V) はシステイン処理すると容易に thiamine に還元されチオクロム反応陽性となり PPC では容易に (VI) と区別できる。(V) は著明に検出されたが (VI) は検出できなかったことより反応溶液中で生成したのは (V) である。イソブタノールで抽出後水層を減圧濃縮、(I') よりは thiamine chloride hydrobromide を、また (I'') よりは thiamine dinitrate を捕捉した。

thiamine に BrCN を加えよく混合した後強アルカリ性とする (IV) が好収量で生成することはすでに報告³⁾ されているが、この場合生成する青酸については報告はない。著者はブルシアン反応で青酸の生成することを確認し、更に定量を行ない (IV) の生成量と一致することを確かめた。このことから thiamine に BrCN を作用させると臭化水素酸ならびに青酸がおのおの 1 mol 生成して 1 mol の (IV) が生成する。また (III) に BrCN が作用して 1 mol の臭化水素酸が生成して 1 mol の (V) が生成することも明らかである。

アンモニウム型 thiamine (I) は水溶液中で一部分加水分解して遊離の塩基 (II), (III) と酸に解離して (I') より塩酸が、(I'') より硝酸が生成することは当然である。すなわち (I') に BrCN が作用すれば (IV), (V) が生成すると同時に塩酸および臭化水素酸が生成して (I') と塩を作り thiamine chloride hydrobromide および thiamine chloride hydrochloride が生成しているはずであるが、thiamine chloride hydrochloride と thiamine chloride hydrobromide の分離には成功しなかつた。また (I'') に BrCN が作用すれば硝酸および臭化水素酸が生成して (I'') と塩を作り thiamine dinitrate の他に thiamine nitrate hydrobromide も生成しているはずである。thiamine nitrate hydrobromide も純品として分離できなかったが、thiamine dinitrate を分離した母液を減圧濃縮後得られた結晶を水に溶解し硝酸銀を加えると白濁することより thiamine nitrate hydrobromide の生成していることも明らかである。

Thiamine, thiochrome および cyanothiamine の分離定量 thiamine は BrCN でほとんど定量的に (IV) になることが報告⁴⁾ されているので、(IV) は thiamine を基準として定量できる。また (V) は pH 7.0 の磷酸緩衝液中チオグリコール酸で定量的に thiamine に還元されることを確かめたので (V) もチオグリコール酸で thiamine に還元した後 BrCN 螢光法で定量できる。(I'), (I'') の 0.005 mol を水に溶解し、BrCN 0.005 mol を水に溶解したものに加え水を加えて 100 cc とし、室温 (10~20°) に放置、一定時間後に Toyo Roshi No 51 A (2×40₂cm) 2 枚に 0.015 cc 塗付し下降法で展開、風乾した後 254 mμ の紫外線を照射すると thiamine (Rf 0.25), (V) (Rf 0.53) は黒色の吸収像として、また (IV) は紫色の特徴ある螢光像として検出できる (Fig 1)。これらを切り取り thiamine は酸性塩化カリウムで、(IV) は 0.01N 塩酸で 80°, 30 分間加熱した後一夜放置する。(V) は pH 7.0 の磷酸緩衝液とチオグリコール酸の混液と共に 50°, 1 時間加熱した後 N 塩酸で pH 約 2.0 とした後一夜放置

2) 川崎, 富田, 元山: ビタミン **13**, 57(1957); 米本: 本誌 **77**, 1128(1957).

3) 松川, 岩津: 本誌 **71**, 14(1951).

4) 南原: 衛生試験 **74**, 81(1956).

する。上記 thiamine および (V) の抽出液は BrCN 螢光法で、またチオクロムは BrCN 液のかわりに水を用い同様に thiamine を基準として定量した。この場合沱紙上に塗付する検体量より起る誤差を補正するため別に反応液中の thiamine をパームチット法で定量し thiamine の定量値から (IV), (V) の量を補正した。これらの結果は Fig. 2, 3 のとおりである。

Fig. 1.

Fig. 2. Action of BrCN on Thiamine Monochloride

—○— thiamine —○— cyanothiamine
—△— thiochrome —●— pH

Fig. 3. Action of BrCN on Thiamine Mononitrate

—○— thiamine —○— cyanothiamine
—△— thiochrome —●— pH

反応の進行とともに臭化水素酸および (I') からは塩酸が、また (I'') からは硝酸が生成するため、反応液の pH は次第に低下し、初めほぼ中性であつた液の pH が 4 時間後には 5.0 になり以後徐々に低下して 4 日後の pH は (I') で 3.42, (I'') では 3.62 になつた。4 日間反応させた後反応液の一部をとり、未反応の BrCN をエーテルで振とう抽出し、水層中の遊離酸をアルカリ滴定によつて定量すると、反応前の thiamine に対してはほぼ当量の酸が生成している。一方銀滴定によつて得られた臭化水素酸の量とアルカリ滴定によつて得られた酸量との差は使用した thiamine から計算される酸量の (I') では 37.8%, また (I'') では 41.6% で反応液中の (I') および (I'') の減少量それぞれ 38.56% および 37.05% とほぼ一致している。

以上の結果から thiamine は水溶液中では (I), (II) および (III) が平衡状態にあつて、これらに BrCN が作用すれば (II) からは (IV) が、(III) からは (V) が生成する。しかし同時に傍生する酸および thiamine から遊離する酸によつて pH が低下するので平衡系は左に移動し反応前の thiamine に対してはほぼ当量の酸が生成するとき BrCN の作用はほとんど停止する。したがつて thiamine monochloride あるいは mononitrate は水溶液中で BrCN に対してかなりの量の (II) および (III) の形をとつて反応する。すなわち生体内で thiamine がかりに (I) の形で存在していても活性形は (II) あるいは (III) であるという仮定を充分裏付けるものと考えられる。

本実験にあたり終始御懇篤なる御指導を賜りました京都大学高橋西蔵教授に深謝する。また御指導御鞭撻下さつた当所刈米所長、小川支所長ならびに中島部長に厚く御礼申し上げる。

実 験 の 部

Thiamine monochloride (I') に対する BrCN の作用 thiamine HCl 塩 6.74 g を水 10 cc に溶解、これに N NaOH 20 cc を加え中和、BrCN 2.1 g を水 60 cc に溶解したものに加え、水で 100 cc とし、2 日間放置後、反応液を Et₂O 50 cc で 5 回振とう、未反応の BrCN を抽出除去した後 iso-BuOH で振とう、水層を減圧濃縮、温 EtOH を加えると淡黄色結晶 3.7 g を得。少量の水に加温溶解、冷後白色結晶析出、沱取、沱液に EtOH を加え放置すると白色結晶析出、1.15 g。EtOH から再結晶、mp 216~217°(decomp), thiamine chloride hydrobromide と混融、融点降下せず。

iso-BuOH 層を乾燥後減圧濃縮乾固, Me_2CO を加え不溶物を汙取, 水少量に溶解, $N\text{NaOH}$ でアルカリ性とした後 *iso*-BuOH で抽出, *iso*-BuOH 層を乾燥後, 減圧濃縮, 残渣に CHCl_3 を加え熱時抽出, 放冷後析出する結晶を汙取, 水より再結晶, mp $228^\circ(\text{decomp})$, thiochrome と混融, 融点降下せず. Me_2CO 抽出液 (PPC で (V) を顕著に検出, Rf 0.53. Dragendorff 試薬, システイン処理後チオクロム反応) を減圧濃縮後 $N\text{NaOH}$ に溶解, 一夜放置すると淡黄色結晶析出. 汙取, 0.2 g, $\text{EtOH} \cdot \text{水}$ から再結晶, 白色鱗片状結晶. mp 109.5° . 無水磷酸上で減圧乾燥, mp $133\sim 134^\circ(\text{decomp})$. (VI) と混融, 融点降下せず.

Thiamine chloride hydrobromide (I') 0.5 g を水 1 cc に溶解, 50% HBr 水 0.15 cc を加えた後熱 EtOH を加えると白色針状品を得. EtOH より再結晶. mp $216\sim 216.5^\circ(\text{decomp})$. $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{ON}_4\text{BrClS}$ 計算値 C 37.75, H 4.75, N 14.63, 実験値 C 37.22, H 4.76, N 14.95.

Thiamine mononitrate (I'') に対する BrCN の作用 (I'') 6.6 g を水 250 cc に溶解, これに BrCN 2.5 g を水 60 cc に溶解した溶液を加えると液は黄緑色に着色し, 螢光を発するようになる. 5 日間放置後 Et_2O 100 cc で 5 回振とう, 未反応の BrCN を除いた後 *iso*-BuOH で振とう抽出. 水層を 30° 以下で減圧濃縮, 黄色残渣を少量の水に溶解し, 温 EtOH を加え放置すると淡黄色結晶析出. 5.5 g. 水および EtOH から再結晶, 無色稜柱状結晶, mp $168\sim 169^\circ(\text{decomp})$, thiamine dinitrate と混融, 融点降下せず. $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{N}_5\text{S}$ 計算値 C 36.92, H 4.65, N 21.53, 実験値 C 36.95, H 5.05, N 21.43. *iso*-BuOH 抽出液を Na_2SO_4 で乾燥, 減圧濃縮後 NaOH 強アルカリ性とする黄色結晶析出, 0.55 g. $\text{EtOH} \cdot \text{水}$ より再結晶. 無水磷酸上減圧乾燥, mp $136^\circ(\text{decomp})$. (VI) と混融, 融点降下せず. (VI) を汙取した汙液を *iso*-BuOH で振とう抽出, 乾燥後減圧濃縮, CHCl_3 で熱時抽出, 放冷すると淡黄色針状結晶析出, 0.2 g. 水から再結晶, mp $230^\circ(\text{decomp})$. thiochrome と混融, 融点降下せず.

Thiamine に対する BrCN および NaOH の作用 HCN の定量 thiamine HCl 塩を水 10 cc に溶解, BrCN 液 10 cc を加えよく混合した後 15% NaOH 液 15 cc を加えた後酒石酸 6 g を加え水蒸気蒸留. 10% NaOH 液 1 滴を加えた水 10 cc 中に受け, 留液 50 cc を取り, 留液に 10% NH_4OH 3 cc, 5% KI 液 2 滴を加え, 0.05N AgNO_3 液で滴定. **Thiochrome の定量** thiamine HCl 塩を水 10 cc に溶解, BrCN 液 10 cc を加えよく混合した後, 15% NaOH 液 5 cc を加えた後 AcOH を加え中和 pH 約 4.0 とした後, pH 3.9 の酢酸緩衝液で 1 cc 中 thiochrome 約 8 γ を含むように希釈して, 393 $\text{m}\mu$ の吸光度より thiochrome の量を求めた⁵⁾. 標準として thiochrome を pH 3.9 の酢酸緩衝液でうすめたものを用いた (Table I). BrCN 液水 100 cc に Br_2 1 cc を加え氷冷よく振とうした後氷冷下 Br_2 の色が脱色するまで 10% KCN 液を徐々に滴加する.

Table I. Production of HCN and Thiochrome by the Action of BrCN and NaOH on Thiamine Hydrochloride

Production of HCN		Production of Thiochrome	
Thiamine (g.)	HCN (%)	Thiamine (g.)	Thiochrome (%)
0.1962	91.28	0.1956	91.71
0.2029	92.99	0.2194	91.43
0.1051	96.92	0.1168	93.08
0.1166	96.04	0.1324	96.69

Cyanothiamine の定量法 試薬. (i) pH 7.0 磷酸緩衝液, 0.2M KH_2PO_4 液 125 cc に 0.2M NaOH 液 65 cc を混合, pH 7.0 に調整した後水を加えて 500 cc とする. (ii) 1% チオグリコール酸水溶液. 1 cc 中 cyanothiamine 89.75 γ を含む溶液 2 cc を 200 cc のメスフラスコに取り, pH 7.0 の磷酸緩衝液 100 cc, チオグリコール酸 50 cc, 水を加えて 200 cc とする. この溶液を 50° の水浴につけ, 10 分毎に 4 cc を取り, 0.1N HCl 2 cc および BrCN 液 4 cc を加えよく混合した後 30% NaOH 液 2 cc を加えこれに *iso*-BuOH 15 cc を加え振とう, *iso*-BuOH 層を分取, Na_2SO_4 で乾燥後比螢光する. 既知濃度の thiamine 液を同様操作したものを標準として定量した. cyanothiamine の thiamine への移行率は 99.8% である (Table II).

Table II. Influence of Warming Time at 50°

Minutes	10	20	30	40	50	60
Fluorescence intensity	83.0	97.0	99.0	100.0	99.0	100.0

Thiamine に対する BrCN の作用 thiamine monochloride あるいは mononitrate 0.005 mol を水 70 cc に溶解, BrCN 0.005 mol を水 20 cc に溶解した液を加え水を加えて 100 cc とする. **アルカリ滴定** 上記溶液を 4 日間放置後 10 cc を取り, Et_2O 10 cc で 5 回洗浄, 水層を 0.1N NaOH 液で滴定 (指示薬 フェノールフタレイン). **HBr の定量** 上記滴定液に HNO_3 を加え酸性とした後, Volhard 法でハロゲンを定量, thiamine monochloride の場合はあらかじめ含有 Cl の量を定量し, 反応後の定量値から差し引き生成 HBr 量とした.

Table III.

	Thiamine	0.1N NaOH	0.1N AgNO ₃
Thiamine monochloride	0.9234 (g.) 61.4 (%)	4.74 (cc.) 94.8 (%)	2.85 (cc.) 57.0 (%)
Thiamine mononitrate	1.0305 (g.) 63.0 (%)	4.75 (cc.) 95.0 (%)	2.67 (cc.) 53.4 (%)

国立衛生試験所大阪支所

UDC 547.835.07 : 547.254.6

林 英作, 大隅貞子, 前田利重: Acridine に対する Grignard 試薬の反応

Eisaku Hayashi, Sadako Ohsumi, and Toshie Maeda: On the Reaction of Acridine with Grignard Reagents.

(Shizuoka College of Pharmacy*)

Various kinds of Grignard reagent were reacted with acridine (I) in ether solution, heated at 100° for 1.5~3 hours in a sealed tube, and 9-substituted acridans (II) were obtained in good yield (Table I). Oxidation of (II) with alkaline potassium ferricyanide afforded 9-substituted acridines (III) (Table II) and this process seemed suitable as a laboratory process for preparation of (III). (III) is easily reduced to (II) with aluminum foil in methanolic solution of sodium methoxide. (II) is well crystallizable and forms crystals of a definite melting point that it is a suitable derivative of (III) for identification purposes.

(Received December 27, 1958)

acridine (I) に対する Grignard 試薬の反応については既に E. Bergmann¹⁾ 等の報告があり, dioxane 中 (I) に $C_6H_5CH_2MgCl$ を作用させ, 17%の収量で 9-benzylacridan および 9-benzylacridine を得たことが記載されている. 著者等は (I) の 9 位に諸種の alkyl, aryl, aralkyl を有する誘導体を実験室的に合成することを目的として好結果を挙げることができた. すなわち溶媒としてエーテルを用い, 封管中で (I) に $RMgX$ を 100° で 1.5~3 hr 反応させ, 後加水分解することにより R がいずれの場合にも好収量で対応する acridan 誘導体が得られる (Table I).

なお本反応はエーテルの沸点程度の温度では反応条件として不十分である. 反応が不十分の場合には未反応の (I) が次の如く反応し, 生成物の分離精製が甚だ困難になる.

* Oshika, Shizuoka.

1) E. Bergmann, W. Rosenthal: J. prakt. Chem. **135**, 267(1932).