過剰の POCl_3 およびトルエンを留去、やや褐色を帯びた結晶性残渣を得る。これを MeOH 含有の温湯に溶解し Na-picrate 飽和水溶液を加え沈殿する (XX) picrate を浮取、水洗、脱水の後 $\text{Me}_2\text{CO} \cdot \text{EtO}$ 混液より数回再結晶。黄色微細プリズム状晶。mp $160 \sim 161^\circ(\text{decomp})$ 。 $\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{N}_2 \cdot 2(\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7\text{N}_3)$ 計算値 C 55.66, H 4.30, 実験値 C 55.73, H 4.49。 HCl 塩は $\text{MeOH} \cdot \text{Me}_2\text{CO}$ 混液より再結晶。無色針状晶 mp $223 \sim 225^\circ(\text{decomp})$ 。

1,1'-(2,2'-Dimethoxy-5,5'-biphenylenylmethyl)bis(2-methyl-3,4-dihydro-6,7-dimethoxyisoquinolinium iodide) (XXII) 3,4-dihydroisoquinoline (XX) 遊離塩基を MeOH に溶解し、これに MeI 過剰量を加えて水浴上 3 hr 加温還流させた後、 MeOH , MeI を留去し残渣を EtOH より再結晶、黄色プリズム状晶。mp $219.5 \sim 220.5^\circ(\text{decomp})$ 。

5,5'-Bis(1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-1-isoquinolylmethyl)-2,2'-dimethoxybiphenyl (XXI) 粗 3,4-dihydroisoquinoline (XX) HCl 塩 1.4 g に Zn 末 1 g, 50% AcOH 30 cc を加えて 2 hr 油浴中に加熱還流。この間適宜になお 1 g の Zn 末を少量ずつ添加。反応終了後 NaOH アルカリ性として CHCl_3 抽出し、無水 K_2CO_3 で乾燥、溶媒を留去、汚褐色鉛状の残渣を得。これを Me_2CO 溶媒で Al_2O_3 クロマト処理により精製したが遊離塩基、 HCl 塩、 H_2SO_4 塩などいずれも結晶し難い。styphnate は結晶として得られ EtOH より再結晶。黄色プリズム状晶。mp $155 \sim 157^\circ(\text{decomp})$ 。粗収量 1.2 g。 $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{O}_6\text{N}_2 \cdot 2(\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_8\text{N}_3)$ 計算値 C 53.86, H 4.52, 実験値 C 54.07, H 4.77。

dl-5,5'-Bis(2-methyl-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-1-isoquinolylmethyl)-2,2'-dimethoxybiphenyl (XXIII) i) 約 700 mg の dimethiodide (XXII) に 50% AcOH 40 cc, Zn 末 1 g を加えて油浴中に 1.5 hr 加熱還流還元を行なう。冷後 Zn 末を浮去した浮液を NaOH アルカリ性として CHCl_3 抽出し、乾燥、溶媒を留去すれば褐色鉛状物質約 300 mg を得。遊離塩基は Al_2O_3 クロマトなどの精製処理を加えても結晶し難いので EtOH を溶媒として styphnate とし、これを $\text{Me}_2\text{CO} \cdot \text{EtOH}$ 混液より再結晶。黄色微針状晶。mp $148 \sim 150^\circ(\text{decomp})$, $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{O}_6\text{N}_2 \cdot 2(\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_8\text{N}_3)$ 計算値 C 54.64, H 4.76, 実験値 C 54.79, H 5.05。

ii) 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline 体 (XXI) 200 mg に 98% 炭酸 10 cc, 35% ホルマリン 4 cc を加えて水浴上に加熱反応させ、減圧下で炭酸、ホルマリンを留去。残渣を NaOH アルカリ性として CHCl_3 抽出。以下 i) と同様の処理をして i) と同一の成績物 130 mg を得。

本研究に際し終始御懇篤なる御指導を頂いた恩師 富田真雄教授に心から感謝致します。また御助言を頂いた犬伏康夫助教授、原料 vanillin を分与せられた高砂香料工業株式会社 奥田 治博士、元素分析を施行された本学元素分析センター穂積啓一郎博士、岩田秀子氏およびその協力者の諸氏に厚く感謝します。

さらに本研究における研究費の一部は文部省科学研究費により支弁したもので、ここに記して謝意を表します。

京都大学薬学部

UDC 577.164.12

136. 角 保男：リボフラビン誘導体の研究(第3報^{*1})

ロイコリボフラビンのアシル化物

Yasuo Sumi: Studies on Riboflavin Derivatives. III.

Leucoriboflavin Acylates.

(Technical Department, Wakamoto Seiyaku Co., Ltd.^{*2})

Leucoriboflavin, reduced form of riboflavin, is easily oxidized to riboflavin when shaken with air. To retain the leuco state, riboflavin was reduced with sodium dithionite or with zinc in acid solution to the leuco compound and its acylation with acetic anhydride or benzoyl chloride gave leucoriboflavin acylate. These compounds were stable in solid state but were easily decomposed to riboflavin acylate on exposure to sunlight or by heating, regaining the yellow color. Several decomposition products of leucoriboflavin acylate are described.

(Received August 4, 1960)

riboflavin は還元により, verdoflavin, chloroflavin の段階的な生成物を経て最終的には無色の leuco 体に

^{*1} 第2報: ビタミン 20, 532(1960).

^{*2} Unane-cho, Setagayaku-Tokyo.

まで還元される¹⁾.

Chart 1.

この還元生成物はいずれも不安定で、空気にふれて容易に酸化を受け、もとの黄色色素 riboflavin にもどる。このために還元型の化学的性質、ことに生理的作用についてはほとんど知られていない。また leucoflavin の誘導体については、いまだ知られていない。著者は riboflavin をその還元型においてアシル化を試み、アセチル、ベンゾイル, ethylformyl を中心とする新誘導体を得た。この系統の化合物としては、Erlenmeyer 等²⁾ が同族体である lumiflavin について還元アセチル化を行なつて 10-acetyl-leuco 体を得ている。

Chart 2.

Fig. 1. Ultraviolet Absorption Spectra

この反応を riboflavin について行なうと、riboflavin は無水酢酸および酢酸には不溶であるが、まず ribityl 基の部分のアセチル化がおこり tetraacetate となつて溶解し均一の溶液になる。つぎに還元が進行して溶液は赤色、緑色と変化し、最終的には無色となり反応は終わる。この際おそらく前述のような段階的な還元が進行してゆくものと思われる。

反応生成物は無色の結晶でその分析値は leucoriboflavin の pentaacetate に一致する。この場合 5 番目のアセチル基の導入位置として 1 位および 10 位が考えられるが、両方の NH を比較してみても 10 位の方が塩基性が大なること、さらに前述の Erlenmeyer の報告の例にある 10-acetyl-lumiflavin と類似の吸収スペクトルを示すことより母核 isoalloxazin 核の 10 位の NH にアセチル基が入ることにより leuco の型が固定されたものと考ええる。また riboflavin を冷時遮光下、水酸化ナトリウム溶液中でハイドロサルファイトによる還元を行ないベンゾイルクロリドおよび ethyl chloroformate による Schotten-Baumann 反応を行なつて、それぞれ penta-benzoate および monoethyl carbonate を得た。この場合もアセチル化の場合と同様に ribityl 基の 4 個の OH および核の 10 位の窒素がアシル化されたものと考ええる。

このうち leuco-acetate はもつとも熱に不安定であり、水溶液中少時加熱を行なうことにより部分的に加水分解を受け溶液は黄色を示してくる。ここに生成する黄色物質をクロロホルムにより抽出精製を行なつたところ、融点および Rf 値が riboflavin tetraacetate に一致した。また leuco-acetate, leuco-benzoate は共に光に対して不安定であり、特に leuco-benzoate は溶液状態あるいは結晶状態で直射日光にさらすと黄色を呈してくる。こ

1) R. Kuhn, *et al.*: Ber. **70**, 747(1937).

2) H. Erlenmeyer, P. Hemmerich: Helv. Chim. Acta **40**, 180(1957).

メタノール中水酸化カリウムによる加水分解物はおなじく Chart 3 の (VI) の構造を有すると考える。

monoethyl carbonate は上記二誘導体に比べると熱にも比較的安定な物質であるが、直射日光下放置するとやはり光分解をうけて反応生成物として riboflavin および lumichrome を生成する。おそらくこの場合には 10 位の ethylformyl 基が光により脱離し、つぎに ribityl 側鎖が通常の光分解をうけるものと考えられるが、これらの leuco 誘導体の光による反応から母核であるイソアロキサチン核は光に対してかなり鋭敏で riboflavin の光分解において重要な役割をなしているものと考えられる。

これらの化合物のうちベンゾイル化物、アセチル化物についてシロネズミによる動物試験を行ない、B₂ 欠乏飼料を用いてビタミン B₂ 添加の場合と、これらの化合物添加の場合を比較したが、これらの化合物はビタミン B₂ 活性を示さず、シロネズミは B₂ 欠乏症状を呈した。またその他の leucoriboflavin の誘導体について鳩肝臓、腎臓ホモジネートを用いて incubate を行なつてみたが、アセチル基の脱離、riboflavin への転換は認められなかった。

実 験 の 部

10-Acetyl-leucoriboflavin 2',3',4',5'-tetraacetate (II) riboflavin 結晶 1 g を Ac₂O·AcOH·H₂SO₄ (50 : 50 : 1) 50 cc と遮光下還流、結晶は徐々に溶解し均一の黄色溶液となる。つぎに加熱を続行しながら Zn 末を少量ずつ添加。さらに 30 min 加熱を続けた後、反応液を熱時戸過、母液を減圧下シロップ状態にまで濃縮、得られた濃縮液に石油ベンゼンを添加して白色の生成物を析出させ、沈殿を母液、石油ベンゼンおよび Et₂O でよく洗浄、乾燥する。得られた反応生成物を CHCl₃ に溶解、石油ベンゼンで再び析出させて無色の粗生成物 1.1 g を得る。

この生成物を NH₄OH 溶液に溶解、HCl 中和による析出をくり返して精製を行ない無色の板状晶 0.8 g を得。mp 158~161°. C₂₇H₂₂O₁₁N₄ 計算値 C 55.10, H 5.44, N 9.52, 実験値 C 54.91, H 5.32, N 9.24.

(II) の加水分解 (I) 500 mg を 30 cc の水に熱時溶解、沸騰水浴上加熱。溶液は徐々に黄色を呈するが、その一部分について 5% Na₂HPO₄ による PPC を行ない Rf 0.49~0.5, riboflavin tetraacetate に一致。20 hr 後反応液を冷却し CHCl₃ で抽出、溶媒を留去して橙黄色の残留物を得。aq MeOH より再結晶をくり返して黄色針状晶を得た。mp 336~337°. riboflavin tetraacetate の標品と混融して融点降下を示さない。

10-Benzoyl-leucoriboflavin 2',3',4',5'-tetrabenzoate (III) riboflavin 結晶 2 g を 8% NaOH に冷時溶解。H₂ 気流中、遮光水冷しながら Na₂S₂O₄ 10 g を添加することにより還元。溶液の赤色が消失し無色になったところで BzCl 8 cc を 2 回にわけて加える。1 hr 後さらに Na₂S₂O₄ 5 g および 8% NaOH 5 cc を添加攪拌を続行。反応生成物が固化したところで反応を停止し水溶液と分離、えられた淡緑色の物質を水でよく洗浄乾燥後ベンゼン 50 cc に溶解、0.1N NaOH で 2 回洗浄、さらに dil HCl および水洗、脱水後濃縮、リグロインを添加して白色の析出物を得る。一夜放置後析出物を母液、石油ベンゼンで洗浄乾燥後 50% AcOH より再結晶をくり返す。mp 112~113°, 無色板状晶。収量 1.3 g。C₃₂H₂₄O₁₁N₄ 計算値 C 69.48, H 4.67, N 6.24, 実験値 C 69.26, H 4.40, N 5.89.

Riboflavin tetraacetate (IV) および tribenzoate riboflavin 結晶 100 mg を 0.6% NaOH に冷時溶解、遮光しながら BzCl 1 g を滴下。水冷下約 3 hr 攪拌後、反応液をベンゼンで抽出、ベンゼン層を dil HCl, dil NaOH および水で洗浄、脱水、減圧で濃縮乾固。黄褐色の残渣について PPC (水飽和ベンゼン) を行なうと Rf 0.04 および 0.88 の 2 つの黄色スポットに分かれる。残渣をベンゼン・ベンジン (10 : 1) に溶解、CaHPO₄ によるカラムクロマトグラフィーを行なうと、カラムの上層に近接した 2 つの黄色帯を生ずる。これをベンゼンで elute すると最初下の方の黄色帯が流下してくる。つぎにベンゼン・Me₂CO (10 : 1) で elute すると上層の黄色帯が流下してくる。この 2 つのフラクションのうちベンゼンで流下してくる部分から溶媒留去後 EtOH より再結晶をくり返して黄色針状晶 40 mg を得。mp 206~207°. C₄₅H₃₈O₁₀N₄ (tetrabenzoate) 計算値 C 68.18, H 4.55, N 7.07, 実験値 C 68.45, H 4.93, N 6.78. ベンゼン・Me₂CO で流下してくる部分は溶媒留去後シクロヘキサン・EtOH 混液より再結晶を行ない、黄色板状晶 10 mg を得。mp 155~158°. C₃₈H₃₂O₉N₄ (tribenzoate) 計算値 C 66.28, H 4.65, N 8.14, 実験値 C 66.50, H 4.48, N 7.82.

(III) の光分解 (III) 10 mg を EtOH に溶解、直射日光下約 8 hr 放置。溶液は橙黄色を呈し、螢光を発するようになる。この溶液について PPC (水飽和ベンゼン) を行ない、Rf 0.88 で riboflavin tetrabenzoate に一致するスポット、およびそれ以外に 2~3 の黄色スポットを認める。反応液を減圧で蒸発乾固させて得られた橙色の残渣を CaHPO₄ によるカラムクロマトグラフィーにかけ、ベンゼン・ベンジン (10 : 1) で吸着させたのち、ベンゼンで elute し、上記 Rf 0.88 の物質を分離、mp 206° の黄色針状晶を得た。この物質は riboflavin tetrabenzoate と混融して融点降下を示さない。

(III) のアルカリ加水分解 (10-benzoyl-leucoriboflavin (VI) および 10-benzoyl-2',3',4',5'-tetraacetate (VII)) (III) 1 g を Me₂CO 6 cc に溶解、これに KOH 150 mg の MeOH 5 cc 溶液を加えて氷室中約 3 hr 放置。赤褐色の析出物を母液で過して除き、淡褐色の母液に Me₂CO を添加してさらに褐色の沈殿を析出させ、この両者を合し

て Me_2CO で洗浄後, dil HCl より再結晶をくり返して黄色針状晶を得る. mp $278^\circ(\text{decomp})$. 5% Na_2HPO_4 による PPC で Rf 0.30 を示し, これは riboflavin に一致.

母液には AcOH 0.5 cc を添加. さらに多量の Et_2O を加えて白色の沈殿を得る. これを遠沈でとり, 乾燥後 $\text{EtOH} \cdot \text{Et}_2\text{O}$ による再沈殿を行なつて白色粉末 200 mg を得る. この物質は不安定なためさらに精製を行なうことなくただちにピリジン 10 cc に溶解, Ac_2O 1 cc を加え一夜放置後氷水にかけ, 淡黄色の析出物を取り乾燥. ベンゼンに溶解させセルロースパウダーに吸着. ベンゼン・ Me_2CO (10:1) を溶出溶媒としてカラムクロマトグラフィーを行ない, mp $143 \sim 145^\circ$ の無色無定形晶を得. $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{O}_{11}\text{N}_4$ (10-benzoyl-leucoriboflavin 2',3',4',5'-tetraacetate) 計算値 N 8.64, 実験値 N 8.77.

(VII) の加水分解 i) 光分解 (VII) 10 mg を EtOH 20 cc に溶解, 直射日光下に約 10 hr 放置. 黄色の反応液をとつて 5% Na_2HPO_4 による PPC をおこなう. 主要なスポットは Rf 0.5 の黄色スポットで riboflavin tetraacetate と一致. 減圧下溶媒を留去して橙色の残渣を $\text{CHCl}_3 \cdot \text{ベンゼン}$ (50:50) に溶解, CaHPO_4 によるカラムクロマトグラフィーを行ない $\text{Me}_2\text{CO} \cdot \text{ベンゼン}$ (10:1) で elute, 溶媒を留去, aq EtOH より再結晶, 黄色針状晶, mp 237° . riboflavin tetraacetate の標品と混融して融点降下を示さない.

ii) HCl 加水分解 (VII) 10 mg を 10% $\text{MeOH} \cdot \text{HCl}$ 20 cc に溶解, 湯浴上 3 hr 煮沸還流しつつけると溶液は黄色に変わる. 反応液を減圧で蒸発乾固, 褐色残渣について前記 i) 同様のカラムクロマトグラフィーを行ない, riboflavin tetraacetate を得.

Leucoriboflavin 10-ethylcarbonate (V) riboflavin 2 g を 2% NaOH 100 cc に溶解, H_2 気流中 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で還元. 氷冷下遮光して攪拌を行ない溶液の赤色が消えたところで ethyl chloroformate 20 g を 2 回に分けて添加. 途中で過剰の ethyl chloroformate の分解による CO_2 の発生をみる. 添加後約 3 hr 攪拌後, 約 100 cc の水を加え, 残っている $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を溶解, 反応液をフェノールで抽出. フェノール層を少量の水で洗浄後減圧濃縮, これに Et_2O を加えて白色の沈殿を生ぜしめる. 得られた沈殿を Et_2O で洗浄乾燥し, MeOH より再結晶, 無色針状晶, 1.3 g を得. mp $248 \sim 250^\circ$. $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{N}_4$ 計算値 C 53.33, H 5.77, N 12.44, 実験値 C 53.51, H 6.01, N 12.71.

(V) の光分解 (V) 10 mg を 50% EtOH に溶解, 直射日光下約 24 hr 放置. 反応液について PPC を行なうと, 5% Na_2HPO_4 では Rf 0.05, 0.29, $\text{BuOH} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4:1:5) では Rf 0.70, 0.31 に螢光を発するスポットが認められる. これらはそれぞれ lumichrome および riboflavin に一致し, 実際に標品と並行して PPC を行なうことにより確認された.

本研究にあたり御教示, 御鞭撻を賜つた柴田 東大教授, 牧野 慈恵医大教授, 動物実験のお世話になつた板井 食研所長に深謝すると共に, 終始御援助をいただいた大池技術部長ならびに元素分析をお願いした星薬大分析室, 慶応薬研分析室の方々に感謝致します.

わかもと製薬株式会社技術部