H, 5.80; N, 4.74. Found: C, 73.44; H, 5.80; N, 4.86. HBr 塩: 無色プリズム状結晶 (MeOH). mp 235—236° (decomp.). $[\alpha]_D^{20} -75^\circ$ ($c=0.76$, MeOH). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 940, 1050 ($\text{CH}_2\text{<O}^-$), 3350 (OH). UV $\lambda_{\text{max}}^{95\% \text{ EtOH}}$ $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon$): 272 (4.44), 317 (3.90). $\lambda_{\text{min}}^{95\% \text{ EtOH}}$ $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon$): 255 (4.26), 298 (3.67). Anal. Calcd. $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{N}\cdot\text{HBr}$: C, 57.45; H, 4.82; N, 3.73. Found: C, 57.46; 57.42; H, 4.86; 4.89; N, 3.83, 3.68.

Base D (Litiriodenine (III)) 鮮黄色針状結晶 (CHCl_3). mp 270—272° (decomp.). CHCl_3 には温時可溶, acetone には溶けにくい. UV $\lambda_{\text{max}}^{95\% \text{ EtOH}}$ $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon$): 248 (4.46), 269 (4.39), 312 (3.85), 417 (4.05). $\lambda_{\text{min}}^{95\% \text{ EtOH}}$ $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon$): 234 (4.35), 259 (4.34), 294 (3.77), 340 (3.45). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 1650 (conj. C=O). liriodenine の標品と混融同定, また IR スペクトル (Nujol) の比較も一致.

Base E, F, G はいずれも微量のため精査せず.

謝辞 本研究に際し御指導を賜った京都薬大 富田真雄学長, NMR の測定, 元素分析に種々便宜を計っていただいた京都大学 犬伏康夫教授, NMR 室 新宮徹朗博士, 分析センターの名位に厚くお礼申し上げます. また貴重な laurilitsine picrolonate のサンプルを分与された神戸女子薬大 中里辰雄教授, ushinsunine および liriodenine を分与された台北医学院 楊 蔵雄教授, 生薬の採集および鑑定に協力された省林業試験所六亀分所 林 維治所長ならびに所員の各位, 台湾大学森林系廖日京副教授に深謝いたします. なお本研究は中華民国国家科学委員会の補助により完成されたものである.

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
89 (9) 1317—1319 (1969)

UDC 615.277 : 547.831.6.02.3

4-Nitroquinoline 1-Oxide (4NQO) による発がん機構解明に関する研究 (第1報¹⁾)

ベンゼン核の特定位置を三重水素標識した 4NQO の合成

馬場茂雄, 鈴木啓郷, 小山田幸雄

東京薬科大学²⁾

Studies on Carcinogenic Mechanisms of 4-Nitroquinoline 1-Oxide

(4NQO). I.¹⁾ Synthesis of 4NQO tritiated at the Specific Position of Benzene Ring

SHIGEO BABA, HIROSATO SUZUKI, and YUKIO OYAMADA

Tokyo College of Pharmacy²⁾

(Received May 2, 1969)

Examinations were made on the methods for tritiating a specific position of the benzene ring in the carcinogenic quinoline derivative, 4-nitroquinoline 1-oxide. Each of the tritiated quinolines, which were obtained by the catalytic hydrogenation of 5-, 6-, 7-, and 8-bromoquinolines with tritium over palladium black, was oxidized with perbenzoic acid and nitrated with potassium nitrate. The loss of tritium under these conditions was only 2%. The labeled position was proved by the infrared and nuclear magnetic resonance spectra of deuterized quinolines which were prepared under the same conditions as for the tritiated compounds.

4-Nitroquinoline 1-oxide (以下 4NQO と略記) は, 1943 年落合等³⁾ によって合成された化合物で, まずその抗かび作用⁴⁾ について報告されたが, 1957 年中原等⁵⁾ がこの化合物に発がん作用があることを報告して以来, 発

1) 日本薬学会第88年年会で発表, 東京, 1968年4月.

2) Location: 4-chome, Kashiwagi, Shinjuku, Tokyo.

3) 落合英二, 石川正雄, 崔 在蓮, 薬誌, 63, 280 (1943).

4) 岡林 直, 醸酵工学雑誌, 33, 513 (1955).

5) W. Nakahara, F. Fukuoka, T. Sugimura, Gann, 48, 129 (1957).

がん物質として注目されている。著者等は 4NQO の生物学的トレーサー実験を行なうのに必要な ^3H -4NQO の合成を試み満足な結果を得た。

4NQO を放射性同位元素で標識する方法としてはまず ^{14}C -quinoline を原料にする方法が考えられる。 ^{14}C による標識法は、標識の安定性および放射能測定の容易さの点では ^3H よりも有利であるが、生物学的トレーサー実験に必要な比放射能をもつ ^{14}C -4NQO を合成することはきわめて困難である。松島等⁶⁾ は ^{14}C -4NQO を使用しているが、その比放射能は低い (0.026 mCi/mmole) ので普通のトレーサー実験に使用するには問題がある。 ^3H で標識する方法としては、4NQO を直接 Wilzbach 法で標識する方法、酸性触媒の存在で交換法により ^3H 標識する方法⁷⁾ などがある。しかしこれらの方法では無作意に標識した標識体しか得られない。また実際に 4NQO に Wilzbach 法を試みたところ、得られた標識体の比放射能は低くしかも多量の分解産物が生成することがわかった。また $^3\text{H}_2\text{O}$ を ^3H 源とする交換法では標識体の比放射能を市販の $^3\text{H}_2\text{O}$ の比放射能 (約 100 mCi/mmole) 以上にはあげることができないという問題点がある。著者等は、4NQO の生理的に不活性側と考えられるベンゼン核の特定位置を ^3H で標識する方法を検討した。なお実験は主として 4NQO-6- ^3H の合成について行なったが、原料に 5-, 7- または 8-bromoquinoline を選べばそれぞれに対応した位置を ^3H で標識した 4NQO を得ることができる。

まず 6-bromoquinoline をリチウム化し、これを $^3\text{H}_2\text{O}$ で分解することにより ^3H -quinoline を合成する方法を検討したが、リチウム化がむずかしく目的を達することができなかった。つぎに Pd 黒の存在で 6-bromoquinoline を $^3\text{H}_2$ で接触還元する方法を試みたところ、還元は容易に起こり、約 35% の放射化学的収率で quinoline-6- ^3H が得られた。最近 *p*-O-tosyloxyacetanilide をラネーニッケルの存在下に $^3\text{H}_2$ または $^3\text{H}_2$ で接触還元するとベンゼン核の水素が無作意に標識された acetanilide が生成することが報告⁸⁾ されている。しかし 5-, 6-, 7- および 8-bromoquinoline を重水素化エタノール中、 $^3\text{H}_2$ の場合と同じように $^3\text{H}_2$ で還元して得られた ^3H -quinoline がそれぞれ個々の赤外線吸収スペクトル (IR) を示すことおよびそれらの核磁気共鳴スペクトル (NMR) も目的の位置一点だけで ^3H 標識されたとして予想されるスペクトルに一致することから、 ^3H の場合も標識の randomness は起っていないと結論できる。

Quinoline 1-oxide の合成には普通 quinoline を 70° で長時間、氷酢-過酸化水素により酸化する方法⁹⁾ が用いられているが、 ^3H 標識体の場合には、この条件下で ^3H が脱離するおそれがあるので、ベンゼン溶液中で過安息香酸により酸化する方法¹⁰⁾ を採用した。

Chart 1. Stability of Label during Synthesis of 4-Nitroquinoline[6- ^3H] 1-Oxide

- 6) T. Matsushima, I. Kobuna, T. Sugimura, *Nature*, **216** 508 (1967).
- 7) Y. Kawazoe, M. Ohnishi, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **15**, 826 (1967).
- 8) D. Jerina, J. Daly, W. Landis, B. Witkop, S. Udenfriend, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3347 (1967).
- 9) 落合英二, 崔 在蓮, 薬誌, **65**, 18 (1945).
- 10) Meisenheimer, *Chem. Ber.*, **59**, 1849 (1926).

最後に quinoline[6- ^3H]1-oxide を濃硫酸に溶解し、硝酸カリウムにより 65° でニトロ化した。なおニトロ化における反応時間と化学的収率の関係を希釈分析法により検討したところ、ニトロ化の収率は反応時間 3 時間でほぼ一定になることがわかったので反応時間は 3 時間にした。ここに得られた 4NQO-6- ^3H の放射化学的純度は薄層およびペーパークロマトグラフ法¹¹⁾により確認した。

この合成法を通じての ^3H 標識の安定性を、比放射能の低い quinoline-6- ^3H を用いて検討した。その結果は Chart 1 に示した。Quinoline-6- ^3H を 1-oxide にするとき比放射能が約 1% 低下する。この 1% の ^3H は、6 位以外の位置 (特に 2 位) を標識していたものではないかという可能性は、この 1-oxide をクロロホルム中三塩化リンで処理¹²⁾ することにより再生された quinoline-6- ^3H を再び 1-oxide にするときにも比放射能が約 1% 低下することから否定された。ニトロ化の段階でも比放射能の低下は約 1% にすぎなかった。

最後に 7.2 mmole の 6-bromoquinoline を 2Ci の $^3\text{H}_2$ で接触還元することによって得られた、Quinoline-6- ^3H を原料にしたところ、95 mCi/mmole という高比放射能の 4NQO-6- ^3H を得ることができた。4NQO は毒性が強く、マウスに対する LD_{50} は 50 mg/kg¹³⁾ である。したがってトレーサー実験には、これよりも少ない投与量で十分な放射能が得られる標識 4NQO が必要であるが、著者等が合成した 4NQO-6- ^3H はこの要求を満たす比放射能をもっている。また大量の $^3\text{H}_2$ を使用することによって比放射能をさらに 1 ケタあげることにも容易である。

実 験 の 部

装 置 IR, NMR, Wilzbach の装置、液体シンチレーション計数装置、ペーパークロマトスキャンナー、薄層クロマトスキャンナーはいずれも 4-dimethylaminoazobenzene の ^3H 標識¹⁴⁾ に使用したものと同一である。

放射能の測定 液体シンチレーション計数装置による放射能の測定は、統計誤差が 1% 以下になるように行なった。 ^3H -quinoline および ^3H -quinoline 1-oxide $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ は秤量に難点があるのでピクラーとして測定した。またこれらのピクラーおよび 4NQO は黄色に着色しているため、カラークエンチングに起因する計数効率の低下を避け、測定誤差を少なくするために、これらの試料の測定は、1—2 mg を精秤し、トルエンに溶かし、その 1/100—1/1000 をとって行なった。

原料化合物の合成 原料の 6- および 8-bromoquinoline はそれぞれ *p*- および *o*-bromoaniline から Skraup のキノリン合成法により合成した。また 5- および 7-bromoquinoline は、*m*-bromoaniline から同法により合成した両者の混合物を重クロム酸塩の溶解度の差により分別することにより得られた。

^3H -4NQO の合成例 Quinoline-6- ^3H の合成—6-Bromoquinoline 1.5 g (7.2 mmole) を 2.5 ml の EtOH に溶かし、Pd 黒触媒 70 mg (試料の約 5%) を加え Wilzbach の装置に接続し、2Ci の $^3\text{H}_2 + \text{H}_2$ で接触還元した。約 3 hr で計算値の水素を吸収した。反応終了後濾過し、溶媒留去後残留物を水に溶かし、アルカリ性でエーテル抽出し、エーテル層を水洗、無水 K_2CO_3 で乾燥後エーテルを留去し残留物を減圧蒸留した。Quinoline-6- ^3H 704 mg (収率 75%)。

Quinoline [6- ^3H] 1-Oxide の合成 上記の quinoline-6- ^3H 704 mg をベンゼンに溶かし、過安息香酸 900 mg を加え、室温で 2 hr かきまぜた。反応液は淡黄色から淡黄緑色になり酸化反応は終了する。溶媒留去後、残留物を分液漏斗に移し、水と ether を加え、過安息香酸および安息香酸を ether 層、quinoline[6- ^3H] 1-oxide を水層にそれぞれ抽出した。水層を減圧濃縮し、残留物を EtOH との蒸留をくり返し行ない完全に脱水した。

上記の quinoline[6- ^3H] 1-oxide を 85% H_2SO_4 10 g に溶かし、65° でかき混ぜながら KNO_3 1 g を少量ずつ加えた。同温度でさらに 3 hr かき混ぜたのち反応物を氷水中に注入した。析出した 4NQO-6- ^3H を濾取し、乾燥後少量の CHCl_3 に溶かし、アルミナカラム (1.5×8 cm) に吸着させ、 $\text{CCl}_4\text{--CHCl}_3$ (2:1) で溶出すると赤褐色の溶出されにくい不純物から分離されて、目的物が溶出してくる。溶媒留去後、少量のアセトンから再結晶し、650 mg の 4NQO-6- ^3H (比放射能 95 mCi/mmole) が得られた。

^3H -Quinoline の合成 Bromoquinoline 5—7 mmole を $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}^2\text{H}$ 2.5 ml に溶かし、 $^3\text{H}_2$ で接触還元した。

謝辞 終りに本研究に対して御鞭撻をいただいた東京薬科大学男子部長、長瀬雄三教授に感謝します。

11) T. Okabayashi, M. Ide, *J. Chromatog.*, **9**, 523 (1962).

12) 浜名政和, 薬誌, **75**, 122 (1955).

13) K. Mori, A. Yasuno, *Gann*, **52**, 149 (1961).

14) 馬場茂雄, 森 幸雄, 岩尾 操, 岩原滋利, 薬誌, **89**, 1158 (1969).