Voges-Proskauer 反応の呈色機構に関する研究¹⁾木嶋敬二,^{2a)} 坂口武一^{2b)}国立衛生試験所,^{2a)} 千葉大学薬学部^{2b)}Studies on the Mechanism of the Voges-Proskauer Reaction¹⁾KEIJI KIJIMA^{2a)} and TAKEICHI SAKAGUCHI^{2b)}National Institute of Hygienic Sciences^{2a)} and Faculty of Pharmaceutical
Sciences, University of Chiba^{2b)}

(Received July 27, 1972)

The mechanism of the Voges-Proskauer reaction was investigated using 1-phenyl-1,2-propanedione (I), morpholinoamidine (II) and α -naphthol in the presence of alkali (Barritt's method). From the nuclear magnetic resonance and mass spectral data, the structures of pigments obtained in the presence of α -naphthol (Barritt's method) were determined as 2-(2-morpholino-4-phenyl-1H-5-imidazolylmethylidene)-1,2-dihydro-1-oxonaphthalene (Pigment A') and 2-morpholino-5-phenyl-4-(2-morpholino-4-phenyl-1H-5-imidazolylmethylidene)-isoimidazole (Pigment C'). Pigment C' was also obtained in the absence of α -naphthol (O'Meara's method). By the reaction of I and II in a nitrogen gas stream, 2-morpholino-4-hydroxy-4-methyl-5-phenyl-4-isoimidazole (Compound D') was obtained. Compound D' produced Pigment A' by the reaction with α -naphthol in an aerobic alkaline solution, and in the absence of α -naphthol, Compound D' produced Pigment C'.

These results indicate that the Voges-Proskauer reaction proceeds through an intermediate such as Compound D'.

Voges-Proskauer 反応 (以下 V-P 反応と略記) には α -ナフトールを加える V-P 反応³⁾ (Barritt 法) と α -ナフトールを加えない V-P 反応⁴⁾ (O'Meara 法) がある。

著者らはさきに guanidino 化合物として morpholinoamidine (II) を用いた α -ナフトールを加える V-P 反応の反応液から発色に寄与していると思われる 4 種の色素, すなわち Pigment A (紫色), B (赤紫色), C (橙色) および D (青色) を分離し, これらのうち α -ナフトールを加えた定量条件で主に生成する Pigment A は 2-(2-morpholino-4-methyl-1H-5-imidazolylmethylidene)-1,2-dihydro-1-oxonaphthalene⁵⁾ であり, α -ナフトールを加えない定量条件での主生成物 Pigment C は 2-morpholino-5-methyl-4-(2-morpholino-4-methyl-1H-5-imidazolylmethylidene)-isoimidazole⁶⁾ であることを報告した。しかし Pigment A, Pigment C の生成過程における中間体の単離には成功していなかった。

そこで今回は diacetyl の代わりに 1-phenyl-1,2-propanedione (I) を用いた V-P 反応について検討した。

実験の部に記載する方法で, I, II および α -ナフトールのアルカリ溶液を反応させると青紫色の反応液 ($\lambda_{\max}$ 582 m μ) を得る。

この反応液を希塩酸で中和すると, 青紫色の沈殿物 (以下粗色素と略記) を得る。粗色素の薄層クロマトグラフィー (TLC) を Fig. 1 に示す。図に示すように, Pigment A' (R_f 0.74, 紫色), C' (R_f 0.64, 赤紫色), B' (R_f 0.30, 紫色) が主スポットで, そのほか E' (R_f 0.40, 淡紫色) のスポットがみられる。また紫外線照射によって D' (R_f

1) 木嶋敬二, 坂口武一, 分析化学, **20**, 1462 (1971) に速報として発表。

2) Location: a) Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo; b) Yayoi-cho, Chiba-shi.

3) M.M. Barritt, *J. Pathol. Bacteriol.*, **42**, 441 (1936).

4) R.A.Q. O'Meara, *J. Pathol. Bacteriol.*, **34**, 401 (1931).

5) 坂口武一, 木嶋敬二, 田辺信三, 井上 保, 小屋原伊一郎, 薬誌, **92**, 1195 (1972).

6) 木嶋敬二, 小屋原伊一郎, 田辺信三, 坂口武一, 薬誌, **91**, 1150 (1971).

0.20) および F' (*R_f* 0.50) のスポットを認める. F' のスポットは原料の α -ナフトールであることが確認された.

D' のスポットに α -ナフトールのアルカリ溶液を噴霧すると赤紫色になる^{1,7)} が, 空气中に放置しても徐々に赤紫色となる. このことから D' のスポットは色素生成の中間体であろうと想像されたので, この物質を compound D' と称することにし, その構造をしらべることにした.

(1) Compound D' の構造について

氷冷下窒素流気中で I および II を反応させ, 反応液から淡緑色の粉末として Compound D' を単離した. Compound D' の Mass スペクトルを Fig. 2 に示す. その分子イオン M^+ ; m/e 259 および高分解能質量測定値 259.130 に対する計算値 259.132 から分子式は $C_{14}H_{17}O_2N_3$ とした. そのほか, つぎの主要フラグメントイオンが観察される.

m/e ; 244 ($M^+ - CH_3$, a), 156 ($\overset{CH_3}{\underset{|}{OH=C-N\equiv C-N}} \text{O}$, b), 141 (b- CH_3 , c), 113 (C-CO, d), 104 ($C_6H_5-\overset{+}{C}=NH$, e), 98 (d-NH, f), 77 (C_6H_5^+ , g).

つぎに NMR スペクトルを Fig. 3 に示す. すなわち 1.60 ppm (singlet) に $-CH_3$ のプロトンを, 3.68 ppm (singlet) に morpholino 基の 8 個分のプロトンを, 4.20 ppm (broad) に OH の 1 個分のプロトンを, 7.30—8.30 ppm (multiplet) には benzene 環に由来する 5 個分のプロトンを認める.

以上のことから Compound D' は 2-morpholino-4-hydroxy-4-methyl-5-phenyl-4-imidazole^{1,8,9)} と決定した.

Fig. 1. Thin-Layer Chromatogram of Crude Pigment Produced by Barritt's Method

adsorbent: Silica gel G
solvent: benzene: methanol (6:1)

Fig. 2. Mass Spectrum of Compound D'

Fig. 3. NMR Spectrum of Compound D' (in $CDCl_3$)

- 7) 坂口武一, 田辺信三, 小屋原伊一郎, 日本薬学会第 91 年会講演旨集.
- 8) T. Sakaguchi, S. Tanabe, T. Nishimura, K. Kijima, International Congress on Analytical Chemistry, Kyoto, 1972, April 3. Abstracts, p. 245.
- 9) 西村民男, 徳 広茂, 上野哲郎, 中野勝男, 日本薬学会第 91 年会講演要旨集.

(2) 発色反応条件下 Compound D' から Pigment A' および C' の生成

Compound D' を MeOH に溶解し、アルカリ性 α -ナフトールを加え、空气中室温で反応させると紫色を呈する。この発色物質は Pigment A' と同一 R_f 値を示し、赤外線吸収 (IR) スペクトルも一致した。また Compound D' を MeOH に溶解し、アルカリ性で空气中室温に放置すると、紫色を呈する。この発色物質は Pigment C' と同じ R_f 値を示し、IR スペクトルも一致した。なお Compound D' を NaOH 液に溶解して、室温に 30 分間放置して得られる紫色の反応液をリン酸酸性とし、30° の水浴中で減圧蒸留して得られた留出液は、アセチルアセトン試液¹⁰⁾ およびクロモトロップ酸試液¹⁰⁾ によって HCHO が検出されたので、Compound D' から Pigment C' の生成過程において HCHO の生成が考えられる。しかし I を同様に処理しても HCHO が検出される場合もあるので、反応過程で HCHO が生成されることを確認するにはいたっていない。反応機構の詳細については次の機会に報告したい。

(3) Pigment A' の構造について

粗色素からアルミナおよびシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって Pigment A' を精製し、黒紫色の柱状晶として単離した。

Pigment A' の Mass スペクトルを Fig. 4 に示す。その分子イオン M^+ ; m/e 383 および高分解能質量測定値 383.165 に対する計算値 383.163 から分子式は $C_{24}H_{21}O_2N_3$ であると決定した。そのほか、つぎの主要フラグメントイオンが観察される。

m/e ; 366 ($M^+ - OH$), 326 ($M^+ - 57$)

Fig. 4. Mass Spectrum of Pigment A'

Fig. 5. NMR Spectrum of the Pigment A' (in DMSO- d_6)

つぎに NMR スペクトルを Fig. 5 に示す。すなわち、3.80 ppm (singlet) に morpholino 基の 8 個分のプロトンを、7.05 ppm (singlet) に $-CH=$ の 1 個分のプロトンを、7.10—8.50 ppm (multiplet) に benzene および naphthalene 環の 11 個分のプロトンを、17.50 ppm (broad) に NH の 1 個分のプロトンを認める。以上のことから Pigment A' の構造を 2-(2-morpholino-4-phenyl-1H-5-imidazolylmethylidene)-1,2-dihydro-1-oxonaphthalene と決定した。

10) 日本薬学会編, 衛生試験法注解, 金原出版, 1965, p. 203.

このことから Pigment A' は II と diacetyl および α -ナフトールをアルカリ性で反応させて得た Pigment A に相当するものであることが明らかである。

(4) Pigment C' の構造について

粗色素からアルミナカラムクロマトグラフィー処理を繰り返して単離精製した紫色針状晶の Pigment C' について NMR, Mass スペクトルからその構造を決定した。Pigment C' の Mass スペクトルを Fig. 6 に示す。その分子イオン M^+ ; m/e 468 および高分解能質量測定値 468.226 に対する計算値 468.227 から分子式は $C_{27}H_{28}O_5N_6$ と決定した。そのほか、つぎの主要フラグメントイオンが観察される。

Fig. 6. Mass Spectrum of Pigment C'

Fig. 7. NMR Spectrum of Pigment C' (in $CDCl_3$)

m/e ; 437 [$M^+ - 1 - (2 \times CH_3)$], 411 ($M^+ - C_3H_5O$), 353 [$M^+ - 1 - (2 \times C_3H_5O)$], 313 [$M^+ - 1 - (2 \times \text{benzene ring})$].

つぎに $CDCl_3$ 中で測定した NMR スペクトルを Fig. 7 に示す。すなわち 3.75 ppm (singlet) に morpholino 基の 16 個分のプロトンを、4.80 ppm (broad) に NH の 1 個分のプロトンを、6.89 ppm (singlet) に $-CH=$ による 1 個分のプロトンを、7.15—7.80 ppm (multiplet) に benzene 核による 10 個分のプロトンを認める。以上のことから Pigment C' の構造を 2-morpholino-5-phenyl-4-(2-morpholino-4-phenyl-1H-5-imidazolymethylidene)-isoimidazol と決定した。

このことから Pigment C' は II と diacetyl をアルカリ性で反応させて得た Pigment C に相

Pigment C'

Pigment A'

Chart 1

当するものであることが明らかである。

上記 (2) から (4) までの結果を総合すると、I および II を用いる V-P 反応はまず Compound D' を中間体として生成し、これを経由して進行する反応であることが明らかである。また前報^{5,6)} の diacetyl を用いた V-P 反応でも同様の経路で反応が進行するものと思われる。

実 験 の 部

装置 融点は未補正。スペクトル類はつぎの機器により測定した。

NMR スペクトル——日本電子製 JEOL Model C 60 HL 内部標準 (Me_4Si)。

Mass スペクトル——日本電子製 JMS-01 SG。

試薬 カラムクロマトグラフィーの SiO_2 は Mallinckrodt 社製、 Al_2O_3 は和光純薬製、1-phenyl-1,2-propanedione, α -ナフトールなどは試薬特級を用いた。Morpholinoamidine 硫酸塩は文献記載¹¹⁾ の方法で合成した。

(1) **Compound D' の単離** II の 0.01 mole を 50 ml の水にとかし、氷水で冷却する。これに 10% NaOH 溶液を加え、pH を約 12 に保つ。 N_2 ガスを通じながら、攪拌後 I の 0.01 mole を少量の EtOH にとかした溶液を加え、20 min 後、冷水を滴下すると淡緑色の粉末を得る。よく水洗し、減圧下、 P_2O_5 で乾燥する。mp 157°。

(2) **Compound D' から Pigment A' および Pigment C' の生成** Compound D' を MeOH に溶解し、 α -ナフトールの 10% NaOH 溶液を加え、室温で 30 min 反応させると紫色を呈する。これを *n*-BuOH で抽出し、抽出物を Fig. 1 に示した条件で TLC を行なうと、そのメインスポットは Pigment A' と同一な *R_f* 値を示した。この部分をかきとり、EtOH で抽出し、溶媒を留去。残留物の IR スペクトルは Pigment A' のそれと一致した。また Compound D' を MeOH に溶解し、10% NaOH 溶液を加え、室温で 40 min 間放置すると紫色の溶液を得る。これを *n*-BuOH で抽出し、以下上記 Pigment A' の場合と同様に TLC を行なうと、そのメインスポットは Pigment C' と同一な *R_f* 値を示し、IR スペクトルも一致した。

(3) **粗色素の生成** II の 0.01 mole を 340 ml の水にとかし、これに α -ナフトールの 0.01 mole を 1N NaOH 液 40 ml にとかした溶液を加える。この液をよく攪拌しながら、I を EtOH 20 ml にとかした溶液を加え、さらに室温で 30 min 攪拌する。この反応液を 2N HCl で中和すると、青紫色の粗色素が沈殿物として得られる。これを吸引濾過して乾燥する。

(4) **Pigment A' の単離** 粗色素を benzene: MeOH (19.5: 0.5) にとかし、活性 Al_2O_3 を用いてカラムクロマト分離を行なう。同じ溶媒で溶出し、紫色のバンドを集め、溶媒を留去する。残留物をクロロホルム:*n*-ヘキサン (3: 2) にとかし、シリカゲルを用いて、残留物をとかした溶媒で再びカラムクロマトグラフィーを行なう。紫色のバンドを集め、溶媒を留去する。残留物を少量の MeOH を含んだエーテルで再結晶を行なうと黒紫色の柱状晶を得る。mp 148°。

(5) **Pigment C' の単離** 粗色素を benzene: MeOH (19.5: 0.5) にとかし、活性 Al_2O_3 を用いてカラムクロマトグラフィーを行なう。同じ溶媒で溶出し、赤紫色のバンドを集め、溶媒を留去し、残留物を *n*-ヘキサン: 酢酸エチル (1: 1) にとかし、この溶媒で再び活性アルミナを用い、カラムクロマトグラフィーを行なう。赤紫色のバンドを集め、溶媒を留去する。残留物を少量の MeOH を含んだエーテルで再結晶を行なう。紫色の針状晶を得る。mp 250°。

謝辞 本研究にあたり種々御助言をいただいた国立衛生試験所 川村次良部長に感謝いたします。