タール剤の成分研究 (第4報¹⁾) 鶏卵乾留タール中の 抗糸状菌性物質について その2

辻 邦郎
静岡薬科大学²⁾

Studies on Active Principles of Tar. IV.¹⁾ Antifungal Constituents in Egg Tar. (2)

KUNIRO TSUJI
Shizuoka College of Pharmacy²⁾

(Received October 13, 1975)

As one of studies on active principles of tar, antifungal constituents in egg tar were examined. An active principle (VI) was isolated by a suitable combination of counter-current distribution and column chromatography. The oily VI (picrate, mp 109°) was found to be identical with a mixture of 2-butyl- and 2-isopentyl-benzimidazoles from physicochemical data of VI and comparison with retention time of authentic sample in gas-liquid chromatography.

タール剤の成分研究の一環として、前報³⁾において鶏卵乾留タールより抗糸状菌物質として5種の β -carboline を分離したことを報告した。すなわち、norharman (I), harman (II), 1-isopentyl (III), 1-(1-methylbutyl) (IV) および 1-isobutyl- β -carboline (V) の5種であるが、これらの抗糸状菌物質を分離したことは、タール剤のもつ生理活性のうちの抗菌作用に対する一つの証左を与えたものである。今回、鶏卵タール中にこれら β -carboline 以外の活性物質の存在が新たに認められたので、前報につづき抗糸状菌活性物質の検索を目的として研究を進め、2種の 2-alkylbenzimidazole を分離したので報告する。また、これらの 2-alkylbenzimidazole の化学構造と抗糸状菌活性との相関関係について検討を加え若干の知見を得たので併せて報告する。

2-Butyl および 2-Isopentylbenzimidazole の分離

分離にあたっては前報同様、指標として抗糸状菌活性を糸状菌 *Trichophyton interdigitale* を被験菌としたディスク法を用いて判定し、活性の強い部分を次の分離の対象とする方法を採用した。今回分離の対象としたフラクションの分離は一部前報に報告済みであるが重ねて報告すると、まず鶏卵 35 kg より得た乾留タールを常法により塩基性部を振り分け、さらにこの塩基性部を塩酸塩として CHCl_3 に不溶部 (1) と可溶部 (2) に分離する。(1)からは先に報告したとおり harman, norharman を分離した。また、(2)の分離を Chart 1 に示すように行った。

すなわち、(2)を 1% 酢酸- CHCl_3 で平衡化したシリカゲルカラムクロマトグラフィー (以下 SiO_2 C.C と略) で分離し AcOEt 溶出部を塩酸- CHCl_3 を用いた向流分配で精製する。このうちで抗糸状菌活性の強い移行回数 0 の部分を蒸留によって6つの留分に分ける。そのうち活性のもっとも強い $\text{bp}_{0.2}$ 175—190° の留分をアルミナカラムクロマトグラフィー (以下 Al_2O_3 C.C と略) で分離精製する。Fig. 1 にその溶出曲線と抗糸状菌活性 (点線) を示した。

この前半部の No. 3—15 から3種の β -carboline を分離したことまでを前報に報告³⁾した。この後半の流出部にも活性が認められたので、今回はフラクション No. 17—30 を分離の対象とした。まずこの部分を SiO_2 C.C, Al_2O_3 薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略), SiO_2 TLC で精製を繰り返し、TLC 上ドラゲンドルフ試薬陽性の単一スポットを示す物質 (VI) を 12 mg 分離した。VI は結晶として分離できなかったがピクレートに誘

1) 第3報: 鳥越泰義, 山本武司, 小菅卓夫, 全田 浩, 薬誌, 93, 39 (1973).

2) Location: 2-2-1 Oshika, Shizuoka.

3) 辻 邦郎, 全田 浩, 小菅卓夫, 薬誌, 93, 33 (1973).

Chart 1. Isolation Procedure of 2-Alkylbenzimidazole

a) diameter of inhibition zone

導し再結晶により精製すると mp 109° (CHCl₃) の針状晶を得る. VI の紫外吸収 (UV) スペクトルは $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ m μ 243, 274, 281, $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + 1N \text{ HCl}}$ m μ 240, 268, 275 に極大吸収が認められ, これは 2-alkyl 置換 benzimidazole の UV スペクトルに酷似する. 核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは低磁場に A₂B₂ タイプのアロマティックプロトンが, また高磁場には炭素数 4—5 に相当するアルキルプロトンが認められる. マススペクトルは *m/e* 188, 174, 146, 132, 92 に比較的強いピークが認められる. 以上のデータより (1) を炭素数 4—5 の 2-alkylbenzimidazole と推定したが微量のためガスクロマトグラフィーによる同定を試みた. Versamid 900, Reoplex 400, OV-17 の 3 種類のカラムを用いた分析の結果, TLC 上単一スポットを示す VI は Fig. 2 に示すとおり主として 2 種の混合物であることがわかった. そこで各種 2-alkylbenzimidazole を合成しその保持時間を比較検討したところ VI のピークは 2-butyl および 2-isopentylbenzimidazole のそれと一致した. さらに合成品の 2-butyl および 2-isopentylbenzimidazole を VI と同じ割合で混合したものの NMR スペクトルは VI のそれと一致し, またマススペクトルのフラグメントパターンおよび TLC での *R_f* 値が天然物のそれとよく一致したことより VI は 2-butyl および 2-isopentylbenzimidazole の混合物であることを確認した. また合成品の混合物の抗糸状菌活性も天然物と同程度であった. なお, このアルキル差に基づく 2 種の化合物の分離を種々試みたが現段階では成功していない.

2-Alkylbenzimidazole の抗糸状菌活性と構造相関について

前項において抗糸状菌作用物質として 2-butyl および 2-isopentyl の 2 種の 2-alkyl 置換 benzimidazole を

Fig. 1. Al_2O_3 Column Chromatogram of Distillated Fraction 5)

---: antifungal activity

Fig. 2. Gas Chromatogram of VI

condition: 20% Versamid 900 on Chromosorb W
1 m $\times$ 3 mm, carrier gas: N_2 (1.0 kg/cm 2 , column
temp. 252 $^\circ$)

TABLE I. Antifungal Activities of Benzimidazoles against *Trichophyton Interdigitale*

<div style="text-align: center;"> Compound </div>	Inhibition zone (mm)		MIC ($\mu\text{g/ml}$)
	0.2 mg/disk	0.5 mg/disk	
R: H	0	0	800
-CH $_3$	0	0	800
-CH $_2$ CH $_3$	0	10	800
-CH(CH $_3$) $_2$	9	12	
-CH $_2$ CH $_2$ CH $_3$	12	21	800
-CH $_2$ CH(CH $_3$) $_2$	8	12	800
-(CH $_2$) $_3$ CH $_3$	20	21	400
-(CH $_2$) $_2$ CH(CH $_3$) $_2$	21	22	400
-(CH $_2$) $_4$ CH $_3$	14	18	100
-CH $_2$ CH(CH $_3$)CH $_2$ CH $_3$	17	18	
-(CH $_2$) $_6$ CH $_3$	10	12	25
-(CH $_2$) $_8$ CH $_3$	0	0	3
-(CH $_2$) $_{10}$ CH $_3$	0	0	1.5
-(CH $_2$) $_{12}$ CH $_3$	0	0	25
-(CH $_2$) $_{14}$ CH $_3$	0	0	50
-(CH $_2$) $_{16}$ CH $_3$	0	0	50

単離したことを述べたが、著者は他のタール剤である大豆粕乾留タールの成分研究の途上同じく 2-alkylbenzimidazole である 2-methyl 体を単離している。⁴⁾ しかし、この 2-methyl 体には抗糸状菌活性は全く認められなかった。そこで活性の発現は alkyl 基の大きさに起因するものと考え Table I に示すように alkyl 基の炭素数の大小と抗糸状菌活性との相関関係を明らかにする目的で各種 2-alkylbenzimidazole を合成し、ディスク法および

4) 日本薬学会第 93 年会発表.

希釈法による検討を加えた。なお、benzimidazole 誘導体については抗腫瘍作用⁵⁻⁷⁾ 抗ウイルス作用⁸⁻¹⁰⁾ を有することが知られており、多くの誘導体についてこれらの生理作用が検討された報告はあるが、抗糸状菌作用に関して alkyl 側鎖の長短との活性相関についての報告はない。著者の検討の結果、Table I に示したようにディスク法では alkyl 基が C_3-C_7 のものに活性が認められ、炭素数 C_0-C_2 および C_9-C_{17} のものには活性は認められなかった。ところが希釈法ではディスク法では全く活性が認められなかった C_9, C_{11} の alkyl 基を持ったものに強い抗糸状菌活性が認められた。

なお、2-butyl, 2-isopentylbenzimidazole は *T. interdigitale* 以外に *T. gypseum. asteroides, T. mentagraphites* に対しても同程度の抗糸状菌活性を示したので今後さらに他の抗菌スペクトルについても検討を加えるつもりである。また抗ヒスタミン作用の目やすとして行なったモルモット回腸を用いたマグヌス法では、 10^{-7} g/ml の histamine による収縮を 20 γ /ml の濃度で 50% 抑制した。

以上、鶏卵乾留タールの成分研究の一環として今回は 2 種の 2-alkylbenzimidazole を抗糸状菌性物質として単離したことを報告したが、この事実は前報の β -carboline 類に加えてタール剤のもつ抗菌作用に対して新たな実験的証左を与えたものである。また、benzimidazole が β -carboline 同様異項環化合物であることは新しい抗菌性物質の開発の面からも興味をもたれる。

実 験 の 部¹¹⁾

抗菌試験 Disk 法——前報の方法に従った。

希釈法——検体を倍数希釈したサブロー培地に被験菌の一定量を接種し、28°, 120—168 hr 培養し、発育が完全に阻止される最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

抗ヒスタミン作用——前報の方法に従った。

分離 (2) 78 g を 1% AcOH- $CHCl_3$ で平衡化した SiO_2 C.C (1.5 kg) で ① $CHCl_3$ (1% AcOH) 6 liter ② AcOEt: MeOH (97:3) 5 liter で溶出。AcOEt: MeOH (97:3) 溶出部を 2N HCl- $CHCl_3$ で向流分配し $r=0$ の部分を減圧蒸留により 6 つの留分に分ける。その $bp_{0.2}$ 175—190° の留分を Al_2O_3 C.C (3×50 cm) で benzene: MeOH (95:5) で溶出 (7 ml/fract.)。そのうち fraction No. 17—30 (300 mg) を SiO_2 C.C (2×40 cm, 5 ml/fract.) にて $CHCl_3$ -AcOEt-MeOH (30:30:0.2) の混合溶媒で溶出。ついで、fraction No. 9—15 をドラージェンドルフ試薬、 I_2 呈色を指標として Al_2O_3 Prep. TLC (benzene-MeOH 150:3), SiO_2 Prep TLC ($CHCl_3$ -AcOEt-MeOH 30:30:0.2) で分離精製し VI を 12 mg 得た。

ガスクロマトグラフィー 装置——島津 GC-3AF 水素イオン化検出器

① Column: 20% Versamid 900 on Chromosorb W (1 m×3 mm), carrier gas: N_2 (1.0 kg/cm²), column bath temp. 252°

② Column: 15% Reoplex 400 on Celite 545 (1 m×3 mm), carrier gas N_2 (1.0 kg/cm²), column bath temp. 200°.

③ Column: 10% OV-17 on Shimalite W (1 m×3 mm), carrier gas: N_2 (1.0 kg/cm²), column vbath temp. 240°.

謝辞 本研究を遂行するにあたり終始変らぬ御教示、御指導を賜りました本学 小菅卓夫教授、全田 浩博士に謝意を表します。また各種測定に御協力いただきました本学総合センター化学分析部の諸氏に感謝致します。

5) H.E. Skipper, L.L. Bennet, P.C. Edward, C.E. Bryan, O.S. Hutchison, J.B. Chapman, M. Bell, *Cancer Res.*, **10**, 166 (1950).

6) J.J. Bieseke, R.E. Bergar, A.Y. Wilson, G.H.H. Hitching, G.B. Elion, *Cancer*, **4**, 186 (1951).

7) H. Mizutani, T. Komai, D. Mizuno, *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **13**, 147 (1960).

8) I. Tamm, H.J. Eggers, *Science*, **142**, 24 (1963).

9) 大滝研也, 井上準之助, 山崎善市, 板谷元一, 高井義治, 安江政一, 水野伝一, 薬誌, **85**, 926 (1965).

10) 秋浜澄行, 高橋勝雄, 宮島教子, 薬誌, **94**, 247 (1974).

11) 融点は未補正, UV は日立 EPS-3T, NMR は日立 R-24 で測定し, 内部基準物質として $Si(CH_3)_4$ を使用した。