6-アミノウラシル誘導体と Ehrlich 試薬との呈色反応機構および
その比色定量法への応用 (第 2 報¹⁾)中島憲一郎
長崎大学薬学部²⁾The Coloration Reaction Mechanism of 6-Aminouracil Derivatives with
Ehrlich Reagent and Its Application to the Colorimetric
Determination Method. II¹⁾

KENICHIRO NAKASHIMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University²⁾

(Received May 2, 1977)

6-Amino-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine and its N- or S-substituted derivatives are hydrolyzed by *p*-toluenesulfonic acid or hydrochloric acid to the corresponding barbiturates. These barbiturates condense with the Ehrlich reagent in the presence of an acid catalyst to afford stable benzyldene compounds. These reactions were found to be almost quantitative. The optimal experimental conditions were also established for using the above reactions for the quantitative colorimetric determination of 6-amino-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine derivatives.

Keywords—6-amino-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine derivatives; Ehrlich reagent; 2-thiobarbituric acids; barbituric acids; *p*-dimethylaminobenzyldene-barbituric acids; coloration reaction mechanism; colorimetric determination

著者は前報³⁾において、6-アミノウラシルおよびその N-メチル誘導体と Ehrlich 試薬との呈色反応の検討を行ない、それを比色定量法へ応用した。今回、6-アミノウラシル誘導体として 6 種の 2-チオおよび 2-アルキルチオ誘導体を合成し、これらと Ehrlich 試薬との呈色反応並びにその比色定量法への応用について基礎的検討を行ない、その反応機構を明らかにするとともに比色定量法にも比較的簡便で精度よく応用しうる結果を得たので報告する。

実験結果および考察

Ehrlich 試薬との反応機構

6-アミノウラシル誘導体は、水野ら⁴⁾ および吉村ら⁵⁾ の合成法に準じて合成し以下の実験に使用した。合成した誘導体は次の 6 種類である。6-Amino-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine (Ia), 6-amino-1-methyl-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine (Ib), 6-amino-1,3-dimethyl-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine (Ic), 6-amino-3-methyl-2-methylthio-4-oxo-3,4-dihydropyrimidine (IVa), 6-amino-2-methylthio-4-oxo-3,4-dihydropyrimidine (IVb), 6-amino-2-benzylthio-4-oxo-3,4-dihydropyrimidine (IVc)。Ia, Ib, Ic, IVa, IVb, IVc の各水溶液に酸触媒として *p*-toluenesulfonic acid (以下 *p*-TSA と略す) または塩酸を加え、沸とう水浴上加熱し、冷後 *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド (以下 *p*-DMAB と略す) を加えると Chart 1 に示した様な構造を有する赤—赤紫色化合物 IIIa, IIIb, IIIc および橙色—橙赤色化合物 VIa, VIb が得られた。また Ia, Ib, Ic, IVa, IVb, IVc を *p*-TSA または塩酸存在下、沸とう水浴上加水分解すると Ia, Ib, Ic からはそれぞ

1) 日本薬学会第 97 年会で発表, 東京, 1977 年 4 月。

2) Location: Bunkyo-machi 1-14, Nagasaki.

3) 中島憲一郎, 薬誌, 97, 202 (1977).

4) 水野義久, 上田 享, 小林道子, 清水 譲, 村上俊孝, 薬誌, 77, 686 (1957).

5) 吉村 実, 畠田孝幸, 出来三男, 杉井通泰, 薬誌, 96, 1094 (1976).

Chart 1. Condensation Reaction of 6-Aminouracil Derivatives and Barbituric Acid Derivatives with *p*-Dimethylaminobenzaldehyde in the Presence of Acid Catalysts

れ対応する 2-チオバルビツール酸誘導体 IIa, IIb および IIc が得られ, IVa, IVb, IVc からは対応するバルビツール酸誘導体 Va, Vb が得られた. これらバルビツール酸誘導体と *p*-DMAB とを *p*-TSA または塩酸存在下反応させると, それぞれ先に得られた色素と同一のものが得られた. 以上の結果より, Ia, Ib, Ic は酸触媒により加水分解を受け対応する 2-チオバルビツール酸誘導体となり, これらの 5 位の活性メチレン基と *p*-DMAB のアルデヒド基で縮合することにより安定な赤色—紅色のベンジリデン誘導体を形成することがわかった. またアルキルチオ基を有する IVa, IVb, IVc では, 酸触媒により, アルキルチオ基とアミノ基の両方が加水分解され, バルビツール酸誘導体となり, 6-アミノウラシルと同様橙赤色—橙赤色のベンジリデン誘導体を形成することがわかった. これらベンジリデン誘導体は前報³⁾に述べたのと同様にジメチルアミノ基の窒素の対電子とベンゼン環, $-CH=C<$ および $C=O$ との共役により Chart 1 に示すような構造式を有する橙赤色—赤色の色素を生じるのではないかと考える.⁶⁾

定量法への応用

次いで上記の反応を 6-アミノウラシル誘導体の定量に応用するための基礎的検討を行なった.

1) 吸収スペクトル Ia, Ib, Ic, IVa, IVb および IVc の各水溶液に *p*-TSA を加え, 沸とう水浴上加水分解し, 放冷後 *p*-DMAB を加え発色させた溶液の吸収スペクトルを試薬ブランクを対照として測定すると, Ia, Ib, Ic では 520 nm, IVa, IVb, IVc では 490 nm 付近にそれぞれ極大吸収を有する吸収スペクトルが得られた.

Fig. 1. Absorption Spectra of the Colored Solution

—, Ia (5.0 $\mu\text{g/ml}$); ----, IVc (5.0 $\mu\text{g/ml}$).
Reaction mixture; sample solution 1.0 ml, 10%
p-TSA 2.0 ml, 1.0% *p*-DMAB (EtOH) 2.0 ml.

Fig. 2. Effect of Concentration of *p*-TSA

○—, Ia; —▲—, Ib; —□—, Ic;
—△—, IVa; —×—, IVb; —●—, IVc.
Reaction mixture; sample solution (5.0 $\mu\text{g/ml}$) 1.0 ml, 10% *p*-TSA 2.0 ml, 1.0%
p-DMAB (EtOH) 2.0 ml.

Fig. 3. Effect of Hydrolyzing on the Formation of Benzyldene Derivatives

○—, Ia; —▲—, Ib; —□—, Ic;
—△—, IVa; —×—, IVb; —●—, IVc.
Reaction mixture; sample solution (5.0 $\mu\text{g/ml}$) 1.0 ml, 10% *p*-TSA 2.0 ml, 1.0% *p*-DMAB (EtOH) 2.0 ml.

Fig. 4. Stability of the Reaction Products

○—, Ia; —△—, Ib; —□—, Ic;
—△—, IVa; —×—, IVb; —●—, IVc.
Reaction mixture; sample solution (5.0 $\mu\text{g/ml}$) 1.0 ml, 10% *p*-TSA 2.0 ml, 1.0% *p*-DMAB (EtOH) 2.0 ml.

Fig. 1 には Ia および IVc から得られた吸収スペクトルを示した。そこで以下の実験における吸光度の測定には、Ia, Ib, Ic は 520 nm, IVa, IVb, IVc では 490 nm を用いた。

2) *p*-TSA の濃度 Ia, Ib, Ic, IVa, IVb および IVc の各水溶液に各種濃度の *p*-TSA を加え、沸とう水浴上分 20 間加水分解を行ない、放冷後 *p*-DMAB を加え 20 分後の吸光度を測定した。濃度に対する吸光度をプロットすると Fig. 2 に示すような結果が得られた。いずれの場合も *p*-TSA の濃度が 10% (w/v)—20% (w/v) でほぼ一定の値を示した。そこで *p*-TSA は 10% (w/v) 水溶液を使用することとした。

3) 加水分解時間 Ia, Ib, Ic, IVa, IVb および IVc の各水溶液に 10% *p*-TSA を一定量加え、沸とう水浴上各時間加水分解し、放冷後 *p*-DMAB を一定量加え 20 分後の吸光度を測定した。時間に対する吸光度をプロットすると、Fig. 3 のような結果が得られた。すなわち Ia, Ic は約 20 分で一定値となり約 60 分後まではほとんど変化が見られなかった。Ib は約 15 分で一定値となり約 30 分後より減少傾向を示した。IVb, IVc は約 30 分で一定値となり約 60 分後まで変化が認められなかった。IVa は約 40 分で一定となった。以上の結果より Ib は Ia, Ic に比べて比較的速やかに加水分解を受けるが、長時間加熱すると更に変化を受けるのではない

1.0 ml, sample solution

2.0 ml, 10 % *p*-toluenesulfonic acid
 heating for 20 min (Ia, Ib, Ic), 40 min (IVa, IVb, IVc) at 97—98°
 standing at room temp., 10—20 min
 2.0 ml, 1.0 % *p*-dimethylaminobenzaldehyde (EtOH soln.)
 standing at room temp. 10—20 min (Ia, Ib, Ic), 20—30 min (IVa, IVb, IVc)

read absorbance at 490 nm (IVa, IVb, IVc), 520 nm (Ia, Ib, Ic)

Chart 2. Experimental Procedure

かと考えられる。IVa, IVb, IVc については、バルビツール酸への加水分解速度が比較的遅いため、ある程度時間を要するものと考えられる。そこで加水分解時間として、Ia, Ib, Ic では 20—30 分、IVa, IVb, IVc では 30—40 分と設定した。

4) 反応生成物の安定性 Ia, Ib, Ic, IVa, IVb, IVc の各水溶液を *p*-TSA で沸とう水浴上一定時間加水分解し、*p*-DMAB で発色後、経時的に吸光度を測定し時間に対してプロットすると Fig. 4 のような結果を得た。すなわち Ia, Ib, Ic では 5—10 分で一定値となり、その後 60 分まで変化が認められず、IVa, IVb, IVc では 15—20 分で一定となり約 60 分後まで安定な値を示した。

以上の定量条件をまとめると Chart 2 のようになり、この条件で各誘導体の検量線を作成すると、いずれの場合も Fig. 5 に示すような Lambert-Beer 則に従う直線関係が得られ、0.5 $\mu\text{g/ml}$ —10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で定量可能であることがわかった。なお、2-チオウラシル類の比色定量法に関する報告としては、2,6-ジクロロキノロンクロイミド法⁷⁾が知られているが、他にはあまり報告が見あたらない。

Fig. 5. Calibration Curves

—○—, Ia; —▲—, Ib; —□—, Ic;
 —△—, IVa; —×—, IVb; —●—, IVc.

実験の部^{8,9)}

使用機器 前報³⁾と同様のものを使用した。

試薬 6-アミノウラシル誘導体の合成——水野らの方法⁴⁾に準じて、シアノ酢酸エチルエステルとチオ尿素、*N*-メチルチオ尿素、*N,N'*-ジメチルチオ尿素有それぞれナトリウムエチラート存在下縮合し、Ia, Ib, Ic を合成した。さらに吉村らの方法に準じて、Ia をジメチルホルムアミド中 KOH 存在下、ジメチル硫酸およびベンジクロリドでアルキル化して IVb, IVc を得た。また IVb をジメチルホルムアミド中 KOH 存在下ヨードメチルでメチル化して IVa を得た。合成した誘導体は水または希 EtOH より再結晶して使用した。

6-Amino-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine (Ia)——*Anal.* Calcd. $\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{OS}$: C, 33.57; H, 3.52; N, 29.37; S, 22.36. Found: C, 33.32; H, 3.30; N, 29.55; S, 22.11. mp >300°, yield 85%.

6-Amino-1-methyl-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine (Ib)——*Anal.* Calcd. $\text{C}_5\text{H}_7\text{N}_3\text{OS}$: C, 38.22; H, 4.49; N, 26.74; S, 20.41. Found: C, 37.79; H, 4.40; N, 26.61; S, 20.54. mp 273—274°, yield 70%.

6-Amino-1,3-dimethyl-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine (Ic)——*Anal.* Calcd. $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{OS}$: C, 42.10; H, 5.30; N, 24.55; S, 18.69. Found: C, 42.07; H, 5.18; N, 24.66; S, 18.79. mp 278—280°, yield 30%.

6-Amino-3-methyl-2-methylthio-4-oxo-3,4-dihydropyrimidine (IVa)——*Anal.* Calcd. $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{OS}$: C, 42.10; H, 5.30; N, 24.55; S, 18.69. Found: C, 41.85; H, 5.25; N, 24.47; S, 18.73. mp 264—266°, yield 45%.

6-Amino-2-methylthio-4-oxo-3,4-dihydropyrimidine (IVb)——*Anal.* Calcd. $\text{C}_5\text{H}_7\text{N}_3\text{OS}$: C, 38.22; H, 4.49; N, 26.74; S, 20.36. Found: C, 37.90; H, 4.41; N, 26.73; S, 20.50. mp 266—267°, yield 60%.

6-Amino-2-benzylthio-4-oxo-3,4-dihydropyrimidine (IVc)——*Anal.* Calcd. $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$: C, 56.63; H, 4.75; N, 18.01; S, 13.74. Found: C, 56.46; H, 4.78; N, 17.91; S, 13.58. mp 250—252°, yield 90%.

その他の試薬はすべて市販特級品を使用した。

7) R.A. Mc Allister, K.W. Howells, *J. Pharm. Pharmacol.*, **4**, 259 (1952).

8) 化合物の融点はすべて未補正。

9) NMR における標準物質は tetramethylsilane (TMS) を使用。

ベンジリデン誘導体の合成 5-*p*-Dimethylaminobenzylidene-2-thiobarbituric Acid (IIIa)——Ia 0.1 g に 10% *p*-TSA 20 ml を加え沸とう水浴上約 1 時間加熱し、冷後 *p*-DMAB (0.2 g in 5 ml EtOH) を加えると赤紫色沈殿が析出する。希 EtOH より再結晶すると mp 269—270° の赤色微細結晶が yield 90% で得られた。Anal. Calcd. $C_{13}H_{13}N_3O_2S$: C, 56.72; H, 4.76; N, 15.27; S, 11.62. Found: C, 56.69; H, 4.70; N, 15.22; S, 11.60. IR cm^{-1} ν_{max}^{KBr} : 1630, 1680 (C=O), 1480 (C=C), 1140 (C=S), 3100, 3400 (NH). NMR (DMSO- d_6) ppm: 3.12 (6H, s), 6.79 (2H, d), 8.19 (1H, s), 8.50 (2H, d), 12.30 (2H, d).

5-*p*-Dimethylaminobenzylidene-1-methyl-2-thiobarbituric Acid (IIIb)——IIIa と同様の方法で赤色微細結晶 mp 260—261° yield 95% を得た。Anal. Calcd. $C_{14}H_{15}N_3O_2S$: C, 58.12; H, 5.23; N, 14.53; S, 11.06. IR cm^{-1} ν_{max}^{KBr} : 1640 (C=O), 1605 (C=C), 1155 (C=S), 3100, 3300 (NH). NMR: 溶媒に難溶のため測定できなかった。

5-*p*-Dimethylaminobenzylidene-1,3-dimethyl-2-thiobarbituric Acid (IIIc)——IIIa と同様の方法で mp 254—255° の赤紫色結晶を得る。Yield 90%. Anal. Calcd. $C_{15}H_{17}N_3O_2S$: C, 59.39; H, 5.65; N, 13.86; S, 10.55. Found: C, 59.48; H, 5.66; N, 13.92; S, 10.37. IR cm^{-1} ν_{max}^{KBr} : 1640 (C=O), 1600 (C=C), 1160 (C=S). NMR (CDCl₃) ppm: 3.16 (6H, s), 3.8 (6H, s), 6.70 (2H, d), 8.68 (2H, d), 8.48 (1H, s).

5-*p*-Dimethylaminobenzylidenearbituric Acid (VIb)——IVb および IVc 0.1 g に 10% *p*-TSA 20 ml を加え沸とう水浴上 1 時間加熱し、冷後 *p*-DMAB (0.2 g in 5 ml EtOH) を加えると橙色溶液となり、数時間放置すると橙色結晶が析出する。希 EtOH より再結晶すると mp 271—272° の橙色針状結晶を得る。Yield 75%. Anal. Calcd. $C_{13}H_{13}N_3O_3$: C, 60.22; H, 5.05; N, 16.21. Found: C, 59.87; H, 5.03; N, 15.96.

5-*p*-Dimethylaminobenzylidene-1-methylbarbituric Acid (VIa)——VIb と同様の方法で mp 264—265° の橙赤色結晶を得る。yield 80%. Anal. Calcd. $C_{14}H_{15}N_3O_3$: C, 61.53; H, 5.53; N, 15.38. Found: C, 61.21; H, 5.63; N, 15.38.

バルビツール酸誘導体の合成 2-Thiobarbituric Acid (IIa)——Ia 0.5 g に 10% *p*-TSA 20 ml を加え沸とう水浴上約 1 時間加熱し、冷後減圧濃縮すると白色結晶が得られる。MeOH より再結晶することにより、mp 235° (dec.), yield 0.2 g の淡黄色結晶を得る。Anal. Calcd. $C_4H_4N_2O_2S$: C, 33.34; H, 12.80; N, 19.44; S, 22.20. Found: C, 33.01; H, 2.89; N, 19.09; S, 21.58.

1-Methyl-2-thiobarbituric Acid (IIb)——Ib 0.5 g に 10% *p*-TSA 20 ml を加え沸とう水浴上約 30 分加熱し放冷後酢酸エチルエステルで抽出し、芒酸で乾燥後、溶媒を留去し得られた残渣を EtOH より再結晶すると、mp 192—194° (dec.), yield 0.3 g の淡黄白色結晶が得られた。Anal. Calcd. $C_5H_6N_2O_2S$: C, 37.98; H, 3.83; N, 17.72; S, 20.23. Found: C, 38.16; H, 3.90; N, 17.45; S, 20.01.

1,3-Dimethyl-2-thiobarbituric Acid (IIc)——Ic 0.2 g を IIb と同様に処理することにより、mp 182—184°, yield 0.15 g の淡黄白色結晶を得る。Anal. Calcd. $C_6H_8N_2O_2S$: C, 41.86; H, 4.68; N, 16.28; S, 18.58. Found: C, 41.65; H, 4.63; N, 16.28; S, 18.77.

Barbituric Acid (Vb)——IVb または IVc の 0.2 g に 10% 塩酸 25 ml を加え沸とう水浴上 30 分加熱し放冷後減圧濃縮し、残渣を EtOH より再結晶すると mp 248—249°, yield 0.1 g の白色結晶を得る。Anal. Calcd. $C_4H_4N_2O_3$: C, 37.51; H, 3.15; N, 21.87. Found: C, 37.25; H, 3.08; N, 21.61.

1-Methylbarbituric Acid (Va)——Vb と同様の方法で mp 130—132°, yield 0.1 g の白色結晶を得る。Anal. Calcd. $C_5H_6N_2O_3$: C, 42.25; H, 4.26; N, 19.71. Found: C, 42.06; H, 4.24; N, 19.99.

バルビツール酸誘導体からのベンジリデン誘導体の合成 IIa, IIb, IIc, Va および Vc の各 0.1 g を 10% *p*-TSA 5 ml に溶解し、2% *p*-DMAB EtOH 液 10 ml を室温で加え放置すると、それぞれ IIIa, IIIb, IIIc, VIa, VIb がほぼ定量的に得られた。

定量操作 Ia, Ib, Ic, IVa, IVb, IVc の 0.5—10 $\mu g/ml$ の濃度の各水溶液 1.0 ml を共栓試験管にとり、10% *p*-TSA 2.0 ml を加え、ゆるく栓をして沸とう水浴上 98° で Ia, Ib, Ic では 20 分、IVa, IVb, IVc では 40 分間加熱し、放冷後 1.0% *p*-DMAB EtOH 溶液 2.0 ml を加え良く混和する。Ia, Ib, Ic では 10—20 分、IVa, IVb, IVc では 20—30 分間室温で放置し、空試験液を対照として層長 10 mm のセルで Ia, Ib, Ic では 520 nm, IVa, IVb, IVc では 490 nm における吸光度を測定する。

謝辞 本研究に対し御鞭撻を賜った本学薬学部 吉村 実教授に深謝するとともに、種々有益な御助言を賜った本学薬学部 小西良士助教授に厚く御礼申し上げます。元素分析を担当された馬詰久子氏、IR の測定をされた大渡 優氏および NMR を測定された稲田勝博氏に感謝の意を表します。