タール剤の成分研究 (第 8 報¹⁾) アミノ酸の乾留による生理活性物質の生成 その 2
フェニールアラニン乾留成績体中の抗糸状菌性物質について

辻 邦郎,^{2a)} 山本武司,^{2b)} 全田 浩, 小菅卓夫^{2a)}

静岡薬科大学,^{2a)} 藤永製薬株式会社^{2b)}

Studies on Active Principles of Tar. VIII.¹⁾ Production of Biological Active
Substances in Pyrolyses of Amino Acids. (2). Antifungal
Constituents in Pyrolysis Products of Phenylalanine

KUNIRO TSUJI,^{2a)} TAKESHI YAMAMOTO,^{2b)} HIROSHI ZENDA and TAKUO KOSUGE^{2a)}

Shizuoka College of Pharmacy^{2a)} and Fujinaga Pharmaceutical Co., Ltd.^{2b)}

(Received December 26, 1977)

Isolation and structural determination of antifungal principles from phenylalanine pyrolysate are described. Two antifungal constituents (I and II) were isolated from the basic fraction of pyrolytic product by means of distillation under reduced pressure, counter-current distribution, and column chromatography. Active principles: (I), liquid, picrate, mp 150—151°; $C_{11}H_9N \cdot C_6H_3N_3O_7$. (II), mp 130—132°; $C_{11}H_{10}N_2$, UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 268 (4.33), 315 (sh); $\lambda_{max}^{MeOH} - HCl$ nm (log ϵ): 262 (4.32), 319 (3.79); picrate, mp 270—272°. They were identified as 3-phenylpyridine and 2-amino-5-phenylpyridine, respectively.

Keywords—pyrolysis of L-phenylalanine; antifungal activity; 3-phenylpyridine; 2-amino-5-phenylpyridine; column chromatography

前報¹⁾において、タール剤中より抗糸状菌性物質として単離された含窒素異項環化合物の生成機構を解明する目的で各種アミノ酸を乾留し、得られた乾留物について抗糸状菌作用を検索した結果、芳香族アミノ酸と塩基性アミノ酸のうち lysine と arginine の乾留物とが活性を示したことを報告した。また、これら含窒素異項環化合物のうち β -carboline 類は tryptophan の熱分解に由来することがその成因の一つとして考えられることを明らかにした。今回は活性を示したアミノ酸乾留物のうち L-phenylalanine の乾留物についてその中に含まれる抗糸状菌作用物質の検索を行ない若干の知見を得たので報告する。

L-Phenylalanine を tryptophan 同様約 350—400° で乾留すると黒褐色粘稠物質が得られるが、この乾留物を常法通り酸性、中性、塩基性部に分け、おのおのの分画について抗糸状菌活性を調べると塩基性部がもっとも強い活性を示した。なお、抗糸状菌活性は前報¹⁾ 同様糸状菌 *T. interdigitale* を被験菌とするディスク法により検討した。この塩基性部を Chart 1 に示した方法により分離を進めた。なお、塩基性部の収量は phenylalanine 600 g より 129 g である。

まず減圧蒸留により分画し、各留分の抗糸状菌活性を調べると bp₇₆₀ 270° 以下の留分は活性を示さず蒸留残渣に比較的強い活性が認められた。この残渣を 1N 塩酸溶液と $CHCl_3$ を溶媒系とする下相移動による向流分配を行なうと γ ³⁾: 0—2 の部分が相対的に強い活性を示したので、この部分をさらに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) により分離精製した。その結果、前半の $CHCl_3$: AcOEt (5:1) 溶出部のうち fraction No. 9—26 と $CHCl_3$: AcOEt (1:1)—AcOEt 溶出部の fraction No. 28—50 に比較的強い活性が認められたのでこの部分をさらに精製した。

まず fraction No. 9—26 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) で分離し活性の認めら

1) 第 7 報: 若林敬二, 山本武司, 辻 邦郎, 全田 浩, 小菅卓夫, 薬誌, 98, 904 (1978)。

2) Location: a) 2-2-1, Oshika, Shizuoka; b) New Tokyo Build. 3-3-1, Marunouchi, Chiyoda-ku, Tokyo.

3) 向流分配において分配管 10 本を用い、下層移動による分配を行ない、1 番目の分配管を $\gamma=0$, 10 番目の分配管を $\gamma=9$ とする。

^{a)} Diameter of inhibition zone.

^{b)} Tube number at 10 transfer stages in counter current distribution.

Chart 1. Isolation Procedure of I and II

れた CHCl₃: benzene (1:1) の溶出部 (fraction No. 20—69) を SiO₂C.C. でさらに精製して CHCl₃: AcOEt (1:2) 溶出部の後半より SiO₂ 薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略) 上 Dragendorff 試薬で単一スポットを示す物質 I を分離した。I は淡黄色透明液体であるが picrate は mp 150—151° を示す針状晶を与える。I は糸状菌に対し 0.5 mg で発育阻止円直径 30 mm の活性を示す。

つぎに SiO₂C.C. における fraction No. 27—50 を SiO₂ C.C. でさらに二度分離精製を繰り返し SiO₂ TLC 上 Dragendorff 試薬で単一スポットを与える物質 II を結晶として単離した。II は mp 130—132° (picrate 270—272°) を示す白色板状晶で 0.5 mg で発育阻止円直径 20 mm の抗糸状菌活性を示す。なお、I, II の収量は phenylalanine 600 g よりおのおの 21 mg および 13 mg である。

I は元素分析および質量分析 (MS) より分子式 C₁₁H₉N と決定され紫外外部吸収 (UV) スペクトルは $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 245, 275 (sh), $\lambda_{\max}^{\text{MeOH} + 1\text{N HCl}}$ nm: 232, 256, 290 (sh) に極大吸収が認められ、プロトン磁気共鳴 (¹H-NMR) スペクトルは $\delta_{\text{ppm}}^{\text{CDCl}_3}$: 6.90—7.75 (m, 7H), 8.50 (d.d, 1H) 8.75 (d, 1H) に芳香族プロトンに相当するシグナルを示した。MS は m/e 155 (M⁺), 128, 102, 83, 51 に比較的強いピークが認められ、赤外吸収 (IR) スペクトルは $\nu_{\max}^{\text{liq film}}$ cm⁻¹: 3025, 1575, 1462, 1441, 1395, 1008, 998, 800, 750, 705, 692 に吸収を示す。以上のデータより (I) を 3-phenylpyridine と推定し Ciamician の方法⁴⁾ に従って合成した標品 (Chart 2) との各種スペクトルの比較およ

4) S. Ciamician, *Chem. Ber.*, 37, 4231 (1904).

Chart 2

び picrate での混融試験により I を 3-phenylpyridine と同定した。

II は元素分析および MS より分子式は $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2$ と決定され、UV は $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 268, 315 (sh) $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}+\text{INHCl}}$ nm: 262, 319 に極大吸収を示し、 $^1\text{H-NMR}$ は $\delta_{\text{ppm}}^{\text{CDCl}_3}$: 4.55 (b, 2H) に NH_2 基のプロトンおよび 6.50 (d, 1H), 7.16—7.70 (m, 6H), 8.25 (d, 1H) に芳香族プロトンに相当するシグナルを示す。MS は m/e 170 (M^+), 143, 115 に比較的強いピークが認められ、IR は $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3350, 3150, 1660, 1603, 1513, 1480, 1450, 1385, 1320, 1260, 1145, 830, 773, 698 に吸収を示した。以上のデータより II を 2-amino-5-phenylpyridine と推定した。Chart 2 に示した方法、すなわち I と NaNH_2 との反応により合成した標品との各種スペクトルの比較および混融試験により II を 2-amino-5-phenylpyridine と決定した。

なお、使用した原料の phenylalanine について上述した I および II の混在の有無をガスクロマトグラフィー (以下 GLC と略) を用いて検討した結果、I および II に相当するピークが全く認められなかったことより I および II は乾留することによってはじめて生成したものであることがあらためて確認された。

以上、phenylalanine の乾留物より抗糸状菌性物質として 3-phenylpyridine および 2-amino-5-phenylpyridine を単離したことを述べたが、このような pyridine 誘導体が活性を示したことは今後の抗糸状菌作用物質の開発研究に一方を与えたものとして興味深い。また phenylalanine のような benzene 核を有する化合物から熱分解により含窒素異項環化合物である pyridine 類が生成したことは有機化学的にも注目されることであり、これらの化合物の生成機構については目下検討中である。

なお、Patterson⁵⁾ らは多くの有機化合物の熱分解反応について研究を展開するなかで phenylalanine についても 650° および 850° での熱分解について検討を加え、GLC を用いて成績体の分析同定を行なっているが、それによると多くの中性芳香族化合物に加えて 650°, 850° のいずれの場合にも異項環化合物として微量ではあるが quinoline を捕捉している。しかしながら pyridine 誘導体を捕捉したとの報告はなく、また成績体のいずれの化合物についてもその生理活性作用については検討されていない。

実験の部

抗菌試験 前報と同様の方法で行なった。

フェニールアラニン乾留物より I, II の分離 市販フェニールアラニン 600 g を 350—400° で加熱乾留し、得られる粘稠物質を常法により中性、塩基性、酸性部に分画。塩基性部 129 g を減圧下蒸留し、 bp_{760} 270° 以下と蒸留残渣に分ける。蒸留残渣 (46.8 g) を 1N HCl 溶液と CHCl_3 を溶媒系とする下相移動による向流分配 ($n=10$) で分離。 $\gamma=0-2$ の部分を SiO_2 C.C. (28×300 mm) にかき CHCl_3 : AcOEt (5:1), CHCl_3 : AcOEt (1:1), AcOEt, AcOEt: MeOH (3:1) の順に溶出。 CHCl_3 : AcOEt (5:1) 溶出部のうち No. 9—26 を Al_2O_3 C.C. にかき CHCl_3 : benzene (1:1) で溶出してくるフラクションのうち No. 20—69 をさらに SiO_2 C.C. で精製する。 CHCl_3 : AcOEt (1:2) 溶出部のうち No. 19—24 より I, 21 mg (30 mm/0.5 mg) を単離した。

つぎに最初の SiO_2 C.C. の CHCl_3 : AcOEt (1:1) と AcOEt 溶出部の No. 27—50 (1.3 g) を SiO_2 C.C. にかき No. 37—55 をさらに SiO_2 C.C. で精製すると AcOEt 溶出部より II, 13 mg (20 mm/0.5 mg) を単離した。

I 淡黄色液体, picrate mp 150—151° (needles) Anal. Calcd. $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$: C, 53.13; H, 3.15; N, 14.58. Found: C, 53.11; H, 3.29; N, 14.36. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 245 (4.15), 275 (sh). $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}+\text{INHCl}}$ nm (log ϵ): 232 (4.11), 256 (4.05), 290 (sh). IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3025, 1575, 1462, 1441, 1395, 1312, 1190, 1105, 1095, 1084, 1008, 997, 900, 800, 750, 705, 692. MS m/e : 155 (M^+), 128, 102, 83, 51. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 6.90—7.75 (m, 7H), 8.50 (d, 1H 4×2 Hz), 8.75 (d, 1H, 2 Hz)。

標品との各種スペクトルデータの比較により 3-phenylpyridine と決定。

II mp 130—132°, picrate 270—272°, Anal. Calcd. $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2$: C, 77.62; H, 5.92; N, 16.46. Found: C, 77.61; H, 5.94; N, 16.27. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 268 (4.33), 3.15 (sh). $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}+\text{INHCl}}$ nm (log ϵ): 262 (4.32), 319

5) J.M. Patterson, N.F. Haidar, E.P. Papadopoulos, W.T. Smith, *J. Org. Chem.*, **38**, 663 (1973).

(3.79). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3350, 3150, 1660, 1603, 1513, 1480, 1450, 1385, 1320, 1260, 1145, 830, 773, 698. MS m/e : 170 (M^+), 143, 115. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4.55 (b, 2H), 6.50 (d, 1H, 8 Hz), 7.16—7.70 (m, 6H), 8.25 (d, 1H, 2 Hz).

2-Amino-5-phenylpyridine の合成 3-Phenylpyridine (I) 1.55 g を dry xylene 100 ml に溶解し, これに NaNH_2 1.56 g を加えた後 17 hr. reflux. 冷後, 反応を傾斜し, 未反応の NaNH_2 を冷却下水を加えてこわす. AcOEt 抽出. 乾燥後溶媒留去, 残渣を SiO_2 C.C. で精製. CHCl_3 溶出部 (1000—1400 ml) より SiO_2 TLC 上単一スポットを与えるフラクションをとり, benzene より再結晶. mp 131—132°, 板状晶, 収量 339 mg.

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: 3% Silicon OV-17. ガラスカラム (1 m $\times$ 3 mm), carrier gas: H_2 (0.8 kg/ cm^2), column temp: 210° ② column: 20% Versamide 900, ステンレスカラム (1 m $\times$ 3 mm), carrier gas: H_2 (1.0 kg/ cm^2), column temp. 193°

謝辞 本研究を遂行するにあたり貴重な御意見と御討論をいただきました本学, 横田正実講師, 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.