Rf 0.59 (quercitrin 0.59) (15% AcOH). Quercitrin の加水分解: juglanin に準じて行ない, quercetin と α -L-rhamnose をそれぞれ IR, PPC で同定した.

Isoquercitrin (XVI) 結晶 (XVI) は淡黄色針状晶, mp 231—233° (AcOEt), 15 mg. Mg-HCl 反応橙赤色, Zn-HCl 反応赤色, M.-U. 反応陽性. 標品 isoquercitrin との混融試験および PPC の比較によって同定した. PPC: *Rf* 0.37 (isoquercitrin 0.37) (15% AcOH). Isoquercitrin の加水分解: juglanin に準じて行ない, quercetin は混融および PPC で, glucose は PPC で同定した.

myo-Inositol (XVII) 結晶 (XVII) は無色針状晶, mp 221—223° (MeOH). M.-U. 反応陽性, Scherer 反応橙赤色, Fick 反応紫色. 標品 myo-inositol との混融試験, IR および GLC によって同定した. GLC は XVIII の pertrimethylsilate について行なった. GLC: *t_R* (min.) 8.6 (myo-inositol pertrimethylsilate 8.6), Column; glass 2.5 mm ϕ $\times$ 1 m, 2%. SE-30, temp; 175°, carrier gas; 0.8 kg/cm².

謝辞 クェルチトリンおよびイソクェルチトリンの標品をお譲り下さいました富山大学教授 森田直賢博士, トリアコンタノールの標品を御恵与下さいました東北大学助教授 近藤嘉和博士, エビスグサの鑑定をして下さいました日本大学教授 滝戸道夫博士, MS の測定をお願いした名城大学薬学部 余合 基氏, 元素分析センターの方々に厚くお礼申し上げます.

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
98 (9) 1291—1296 (1978)

UDC 547.831.9.04.09:615.281.011.5.076.7

化学療法剤の合成研究 (第 6 報¹⁾) 6- および 7-Carbamoyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic Acid 誘導体の合成 (複素環式化合物の合成研究 第 761 報²⁾)

亀谷哲治,^{3a)} 気賀沢和雄, 柊木峯治, 脇坂菊雄, 芳賀清次, 草間 攻,
杉 秀夫, 川崎久米雄, 谷川啓造^{3b)}
東北大学薬学部,^{3a)} グレラン製薬研究所^{3b)}

Studies on the Synthesis of Chemotherapeutics. VI.¹⁾ Synthesis of 6- and 7-Carbamoyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic Acid Derivatives (Studies on the Syntheses of Heterocyclic Compounds. DCCLXI²⁾)

TETSUJI KAMETANI,^{3a)} KAZUO KIGASAWA, MINEHARU HIIRAGI, KIKUO WAKISAKA,
SEIJI HAGA, OSAMU KUSAMA, HIDEO SUGI, KUMEO KAWASAKI,
and KEIZO TANIGAWA^{3b)}

Pharmaceutical Institute, Tohoku University^{3a)} and Research
Laboratories, Grelan Pharmaceutical Co., Ltd.^{3b)}

(Received March 1, 1978)

In order to evaluate their antimicrobial activity, 6- and 7-carbamoyl-1-ethyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid derivatives (2) were prepared. Thermal cyclization of diethyl N-(4- and 3-carbamoylphenyl)aminomethylenemalonates gave 6- and 7-carbamoylquinolines, which, on alkylation followed by hydrolysis, afforded 2.

Keywords—carbamoylquinoline; N-ethyl-4-oxoquinoline-3-carboxylate; (carbamoylphenyl)aminomethylenemalonate; thermal cyclization; antimicrobial activity

1,4-Dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid 型化合物はグラム陰性菌などに対して抗菌活性を有する化合物であることが見出されて以来, 各種の 5, 6, 7 および 8-モノ置換,⁴⁾ および多置換⁵⁾ の誘導体 (1a) の合成が報告

1) 第 5 報: 亀谷哲治, 気賀沢和雄, 柊木峯治, 脇坂菊雄, 芳賀清次, 草間 攻, 杉 秀夫, 谷川啓造, 薬誌, 98, 1063 (1978).

2) 第 760 報: T. Kametan, C. V. Loc, M. Ihara, K. Fukumoto, *Heterocycles*, 9, 1585 (1978).

3) Location: a) Aobayama, Sendai-shi, 980, Japan; b) Sakurashinmachi, Setagaya-ku, Tokyo, 154, Japan.

1a: $R_1=5, 6, 7,$ and/or
8-substituent
 $R_2, R_3=H$ or C_2H_5
1b: $R_1=6-CONH_2$;
 $R_2=H; R_3=C_2H_5$

$R=6$ or 7 -carbamoyl
group: $CONH_2$
($R'=H$ or C_2H_5)

Chart 1

3 and 5: **a;** $R=3-CONH_2$ **2, 6, 7 and 8:** **a;** $7-CONH_2$
b; $R=3-CON(C_2H_5)_2$ **b;** $7-CON(C_2H_5)_2$
c; $R=4-CONH_2$ **c;** $6-CONH_2$
d; $R=4-CON(C_2H_5)_2$ **d;** $6-CON(C_2H_5)_2$

Chart 2

されている。これらの中で置換基の種類および位置と抗菌活性との関係は未だ明らかにされていない点が多い。モノ置換化合物のなかで 5-置換体はほとんど抗菌活性を示さないが、7-置換体あるいはそれらの N_1 -ethyl 誘導体には他の置換様式の化合物と比較し、より強い抗菌活性が認められることが報告された。^{4c,6)} 一方、6-置換化合物 (**1b**) にも抗真菌作用が見い出されている。^{4d)} 近年、 N_1 位に置換基を有しない 1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid 誘導体 (**1a**) は酵素阻害剤を目的としてそれらの広範な誘導体の合成とその薬理評価がなされ、⁷⁾ なかでも 7-置換体^{7c)} が注目されている。

著者らは前報^{1,8)} において新規化学療法剤の探索を目的として各種 pyrazoloquinolinecarboxylic acid 誘導体

- 4) a) 大日本製薬, 特開昭 49-82670 (1974); b) 山の内製薬, 特開昭 48-26772 (1973) および 50-49286 (1975); c) H. Agui, T. Komatsu, T. Nakagome, *J. Heterocycl. Chem.*, **12**, 557 (1973); d) Squib 社 Ger. Offen. 2146675 (1972).
- 5) a) D. Kaminsky, R.I. Meltzer, *J. Med. Chem.*, **11**, 160 (1968); b) Warner-Lambert 社, France Patent 2002888 (1969); c) Merck 社, U.S. Patent 3542781 (1971); d) ICI 社, 特公昭 44-23499 (1969) および 45-14792 (1970).
- 6) R. Albrecht, J. Kebier, *Chimie Therapeutique*, **14**, 345 (1972).
- 7) a) B.R. Baker, R.R. Brambell, *J. Med. Chem.*, **15**, 230, 233, 235, 237 および 937 (1972); b) M. Yoshimoto, C. Hansch, *ibid.*, **19**, 71 (1976); c) K.J. Shah, E.A. Coats, *ibid.*, **20**, 1001 (1977).
- 8) a) T. Kametani, K. Kigasawa, M. Hiiragi, K. Wakisaka, O. Kusama, H. Sugi, K. Kawasaki, *J. Heterocycl. Chem.*, **14**, 1175 (1977); b) 亀谷哲治, 気賀沢和雄, 柊木峯治, 脇坂菊雄, 草間 攻, 杉 秀夫, 谷川啓造, 薬誌, **98**, 1158 (1978).

の合成について報告したが、今回は本研究の一環として文献未知の 6-および 7-carbamoyl-1-ethyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid 誘導体 (2) の合成を行ったので報告する。

4-Oxoquinoline 骨格の合成法は種々知られているが、最も短工程で 3 位に carboxyl 基を導入した目的化合物を得るため Gould-Jacobs 反応⁹⁾ を経由する方法を採用した。すなわち、Chart 2 に示す経路に従って、出発原料として 3-および 4-carbamoylaniline (3) を用い、3 と diethyl ethoxymethylenemalonate (4) を加熱縮合させれば容易に enamine 型化合物 (5) が得られた。

ついで、5a の閉環をまず PPA-POCl₃ を用いて行ったところ、多数の成績体を伴ない目的物を単離することが困難であったので、以後、本閉環反応は加熱による方法を採用した。すなわち、5 を Gould-Jacobs 反応の条件下 diphenyl ether 中、250—280° にて加熱したところ容易に期待した閉環体 6 がいずれの場合も好収率で単一成績体として得られた。ここで、3-carbamoyl 体 (5a) および (5b) の閉環位に関して、C₂ および C₆ 位の 2 方向が考えられたが、それぞれ C₆ 位で閉環した成績体 6a および 6b のみが選択的に得られ、C₂ 位で閉環した成績体は得られなかった。すなわち、6a および 6b はそれらの nuclear magnetic resonance (NMR) スペクトル¹⁰⁾ において、芳香核プロトンが 6c および 6d と同様な 1,3,4-置換を示す coupling pattern を示した。

閉環体 6 を水酸化ナトリウムで短時間処理すると、エステルのみが選択的に加水分解を受け、¹¹⁾ カルボン酸誘導体 (8) が得られた。また炭酸カリウムの存在下、ethyl iodide と反応させ、それぞれ相当する 6-および 7-carbamoyl-1-ethyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid 誘導体 (7) を得た。なお、この構造は NMR スペクトルにおいて N₁-ethyl 基に相当するシグナルが新たに見られることから確認した。¹²⁾ 7 を加水分解することによって容易に目的とする 6-および 7-carbamoyl-1-ethyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid (2) を得ることができた。¹⁰⁾

以上のように 3-および 4-carbamoylphenylaminomethylenemalonate (5) の熱閉環反応を経由し、種々の 6-および 7-carbamoyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid 誘導体 (6, 7, 8 および 2) を得ることに成功した。これらの抗菌活性ならびに種々の生理活性試験については現在詳細に検討中である。

実験の部¹³⁾

3-(N,N-Diethylcarbamoyl)aniline (3b) 文献既知の方法¹⁴⁾ に従って得た 3-(N,N-diethylcarbamoyl) nitrobenzene 22.22 g, 35% HCl 50 ml, 水 30 ml および EtOH 60 ml の混合物中に水浴上 70—85° にて鉄粉 18 g を 30 min を要して添加し、さらに 1 hr 加熱。反応混合液をセライトと共に攪拌後ろ過。ろ液からエタノールを留去後、50% NaOH 水溶液を加えアルカリ性となし、C₆H₆ 抽出。抽出液を水洗、乾燥 (K₂CO₃) 後、C₆H₆ を留去して得られる残留固形物を ether-石油エーテルより再結晶し mp 85—86° の微黄色結晶 16.2 g (84.3%) を得。Anal. Calcd. C₁₁H₁₆N₂O: C, 68.72; H, 8.39; N, 14.57. Found: C, 68.63; H, 8.40; N, 14.40. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3400, 3325, 1640. NMR (δ in CDCl₃): 3.73 (2H, s, D₂O 添加により消失, NH₂), 3.41 (4H, distorted q, J=7 Hz, 2×NCH₂CH₃), 1.15 (6H, t, J=7 Hz, 2×NCH₂CH₃)。

Diethyl N-(3-および 4-carbamoylphenyl)aminomethylenemalonate (5a, 5b, 5c および 5d) a) 市販の 3-aminobenzamide (3a) 10.0 g, 4 16.6 g, および C₆H₆ 12 ml の混合物を沸騰水浴上 30 min 還流。反応終了後、溶媒を留去して得られる固形物を少量の EtOH で洗浄し mp 174—176° の無色粉末として 5a 21.5 g (95.6%) を得。本品は EtOH から再結晶すれば mp 179—180° の無色針状晶となる。Anal. Calcd. C₁₅H₁₈N₂O₅: C, 58.81; H, 5.92; N, 9.15. Found: C, 58.55; H, 5.77; N, 9.00. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3390, 3270, 1680, 1640. NMR (δ in CDCl₃): 11.16 (1H, d, J=13 Hz, D₂O 添加により消失, NH-), 8.52 (1H, d, J=13 Hz, $\begin{matrix} \text{---HN} \\ | \\ \text{H} \end{matrix}$), 6.6—6.2 (2

9) R.G. Gould Jr., W.A. Jacobs, *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 2890 (1939).

10) 6-および 7-carbamoylquinoline-3-carboxylic acid 誘導体 6, 7, 8, および 2 の融点、収率、元素分析、infrared (IR), NMR データは Table I に一括して示した。

11) a) H.H. Jaffe, *Chem. Rev.*, **53**, 191 (1953); b) M. Igarashi, H. Midorikawa, *J. Org. Chem.*, **28**, 3088 (1963).

12) 本反応の条件下における類似の 1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid 誘導体の ethyl 化反応では、O-ethyl 化は進行せず、選択的に N-ethyl 化が進行することが知られている：文献 4c, 5a。

13) 融点はすべて未補正。NMR スペクトルは JEOL PMX-60 を用い、tetramethylsilane を内部基準として測定した。

14) J.P. Jung, E. Sorkin, *Helv. Chim. Acta*, **29**, 1960 (1946).

H, br.s, CONH₂), 4.31, 4.26 (each 2H, q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$), 1.38, 1.32 (each 3H, t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$).

b) 上記 a) と同様の方法に従い 3b から無色油状物として 5b を得た。収率 98.4%。Anal. Calcd. C₁₉H₂₆N₂O₅: C, 62.96; H, 7.23; N, 7.73. Found: C, 63.07; H, 7.35; N, 7.81. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{neat}}$ cm⁻¹: 1710, 1680, 1640. NMR (δ in CDCl₃): 10.14 (1H, d, $J=13$ Hz, D₂O 添加により消失, NH-), 8.44 (1H, d, $J=13$ Hz, $\begin{smallmatrix} \text{HN} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \end{smallmatrix}$), 4.31, 4.25 (each 2H, q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$), 3.42 (4H distorted q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$), 1.35, 1.33 (each 3H, t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$), 1.21 (6H, t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$).

c) 上記 a) と同様の方法に従い, 3c から mp 209—210° の無色鱗片晶 (EtOH から再結晶) として 5c を得た。収率 59.5%。Anal. Calcd. C₁₅H₁₈N₂O₅: C, 58.81; H, 5.92; N, 9.15. Found: C, 59.05; H, 6.04; N, 8.88. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3400, 3200, 1670, 1635. NMR (δ in DMSO-*d*₆): 10.72 (1H, d, $J=13$ Hz, D₂O 添加により消失, NH-), 8.44 (1H, d, $J=13$ Hz, $\begin{smallmatrix} \text{HN} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \end{smallmatrix}$), 4.24, 4.15 (each 2H, q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$), 1.27 (6H, t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$).

TABLE I. 6- and 7-Carbamoyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic Acid Derivatives

Compound No.	mp (°)	Appearance (Solvent of recrystn.)	Yield (%)	Formula	Analysis (%)			IR ($\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$) cm ⁻¹
					Calcd. (Found)	C	H	N
6a	298—299	Pale yellow brown crystal (methanol)	58.8	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₄ ·1/4 H ₂ O	58.98 (59.12)	4.76 4.46	10.58 10.60	1695, 1665 1630
6b	283—284	Colorless crystal (ethanol)	53.3	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₄	64.54 (64.47)	6.37 6.27	8.86 8.84	1690, 1625 1610
6c	292—294	Pale yellow crystal (acetic acid)	62.8	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₄	59.99 (59.44)	4.65 4.56	10.77 10.77	1690, 1630
6d	255—256	Pale yellow crystal (acetic acid)	74.7	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₄	64.54 (64.39)	6.37 6.48	8.86 8.90	1695, 1635 1625
7a	239—241	Colorless crystal (ethanol)	28.9	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₄	62.49 (62.01)	5.59 5.93	9.72 9.65	1700, 1640 1615
7b	128—129	Colorless crystal (ethyl acetate)	85.1	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄	66.26 (66.60)	7.02 7.08	8.13 8.22	1710, 1625 1610
7c	207—213	Faintly yellow crystal (ethanol)	28.9	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₄	62.49 (62.15)	5.59 5.27	9.72 9.50	1680, 1635
7d	129.5—130.5	Colorless crystal (ethanol)	23.3	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄	66.26 (65.99)	7.02 6.98	8.13 8.05	1680, 1620
8a	>300	Colorless crystal (methanol)	57.4	C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₄ ·1/2 H ₂ O	54.77 (54.75)	3.76 3.40	11.62 11.57	1700, 1630 1610
8b	228—230	Colorless crystal (ethyl acetate)	87.9	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₄	62.49 (62.27)	5.59 5.60	9.72 9.62	1700, 1630 1610
8c	>300	Colorless crystal (methanol)	74.7	C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₄ ·1/4 H ₂ O	55.82 (55.39)	3.63 3.29	11.83 11.49	1695, 1635 1615
8d	241—242	Colorless crystal (ethanol- <i>n</i> -hexane)	80.5	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₄	62.49 (62.31)	5.59 5.61	9.72 9.58	1730, 1615
2a	>300	Colorless crystal (ethanol)	70.9	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₄ ·1/4 H ₂ O	58.98 (59.12)	4.76 4.46	10.58 10.60	1715, 1610
2b	173—174	Colorless crystal (ethyl acetate)	96.2	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₄	64.54 (64.14)	6.37 6.35	8.86 8.83	1705, 1615
2c	>300	Colorless crystal (ethanol)	66.5	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₄	59.99 (59.58)	4.65 4.97	10.77 10.71	1690, 1620
2d	191—192	Colorless crystal (ethanol)	86.5	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₄	64.54 (64.35)	6.37 6.29	8.86 8.60	1720, 1625

Compound No.	NMR [δ in $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (a), in $\text{DMSO}-d_6$ (b), in CDCl_3 (c), or in CD_3OD (d)] ^{a)}
6a	(a): 8.87, 8.40 (each 1H, d, $J=9$ Hz, $\text{C}_{5,6}\text{-H}$), 8.80 (1H, s, $\text{C}_8\text{-H}$), 4.77 (2H, q, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3), 1.59 (3H, t, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3).
6b	(a): 8.78 (1H, d, $J=9$ Hz, $\text{C}_5\text{-H}$), 8.32 (1H, d, $J=1.5$ Hz, $\text{C}_6\text{-H}$), 7.97 (1H, dd, $J=9, 1.5$ Hz, $\text{C}_6\text{-H}$), 4.71 (2H, q, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3), 3.83, 3.48 (each 2H, q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$), 1.58 (3H, t, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3), 1.46, 1.31 (each 3H, t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$).
6c	(a): 9.33 (1H, d, $J=2$ Hz, $\text{C}_5\text{-H}$), 8.77 (1H, dd, $J=9, 2$ Hz, $\text{C}_7\text{-H}$), 8.23 (1H, d, $J=9$ Hz, $\text{C}_8\text{-H}$), 4.79 (2H, q, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3), 1.56 (3H, t, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3).
6d	(b): 8.09 (1H, s, $\text{C}_6\text{-H}$), 7.68 (2H, s, $\text{C}_{7,8}\text{-H}$), 4.28 (2H, q, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3), 3.38 (4H, q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$), 1.33 (6H, t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$), 1.31 (3H, t, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3).
7a	(c): 8.45 (1H, d, $J=8$ Hz, $\text{C}_5\text{-H}$), 8.31 (1H, dd, $J=8, 2$ Hz, $\text{C}_6\text{-H}$), 4.41 (2H, q, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3), 4.36 (2H, q, $J=7$ Hz, NCH_2CH_3), 1.58 (3H, t, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3), 1.43 (3H, t, $J=7$ Hz, NCH_2CH_3).
7b	(c): 8.52 (1H, d, $J=8$ Hz, $\text{C}_5\text{-H}$), 7.40 (1H, dd, $J=8, 2$ Hz, $\text{C}_6\text{-H}$), 4.39, 4.28 (each 2H, q, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3 , NCH_2CH_3), 3.43 (6H, distd. q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$), 1.55, 1.41 (each 3H, t, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3 , NCH_2CH_3), 1.13 (6H, distd. t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$).
7c	(b): 9.08 (1H, d, $J=2$ Hz, $\text{C}_5\text{-H}$), 8.50 (1H, dd, $J=9, 2$ Hz, $\text{C}_7\text{-H}$), 4.43, 4.28 (each 2H, q, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3 , NCH_2CH_3), 1.43, 1.32 (each 3H, t, $J=7$ Hz, OCH_2CH_3 , NCH_2CH_3).
7d	(d): 8.45 (1H, d, $J=2$ Hz, $\text{C}_5\text{-H}$), 7.73 (1H, dd, $J=9, 2$ Hz, $\text{C}_7\text{-H}$), 3.50 (4H, distd. q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$), 1.53, 1.41 (each 3H, t, OCH_2CH_3 , NCH_2CH_3), 1.26, 1.23 (each 3H, t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$).
8a	(a): 9.51 (1H, s, $\text{C}_2\text{-H}$), 9.00 (1H, d, $J=2$ Hz, $\text{C}_8\text{-H}$), 8.89 (1H, d, $J=10$ Hz, $\text{C}_6\text{-H}$), 8.68 (1H, dd, $J=10, 2$ Hz, $\text{C}_6\text{-H}$).
8b	(a): 9.42, 8.33 (each 1H, s, $\text{C}_{2,8}\text{-H}$), 8.81, 7.98 (each 1H, d, $J=8$ Hz, $\text{C}_{5,6}\text{-H}$), 3.80, 3.41 (each 2H, q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$), 1.38, 1.23 (each 3H, t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$).
8c	(b): 8.91, 8.82 (each 1H, s, $\text{C}_{2,5}\text{-H}$), 8.32, 7.87 (each 1H, d, $J=8$ Hz, $\text{C}_{8,7}\text{-H}$).
8d	(a): 9.53, 8.85 (each 1H, s, $\text{C}_{2,5}\text{-H}$), 8.39 (2H, s, $\text{C}_{7,8}\text{-H}$), 3.92, 3.55 (each 2H, q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$), 1.49, 1.37 (each 3H, t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$).
2a	(a): 9.57, 9.06 (each 1H, s, $\text{C}_{2,8}\text{-H}$), 8.98, 8.71 (each 1H, d, $J=8$ Hz, $\text{C}_{5,6}\text{-H}$), 5.09 (2H, q, $J=7$ Hz, NCH_2CH_3), 1.89 (3H, t, $J=7$ Hz, NCH_2CH_3).
2b	(c): 8.87 (1H, s, $\text{C}_2\text{-H}$), 8.56 (1H, d, $J=8$ Hz, $\text{C}_5\text{-H}$), 7.54 (1H, dd, $J=8, 1.5$ Hz, $\text{C}_6\text{-H}$), 7.71 (1H, d, $J=1.5$ Hz, $\text{C}_8\text{-H}$), 4.49 (2H, q, $J=7$ Hz, NCH_2CH_3), 3.45 (4H, distd. q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$), 1.61 (3H, t, $J=7$ Hz, NCH_2CH_3), 1.41 (6H, t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$).
2c	(b): 9.14 (1H, s, $\text{C}_2\text{-H}$), 8.97 (1H, d, $J=2$ Hz, $\text{C}_5\text{-H}$), 8.46 (1H, dd, $J=9, 2$ Hz, $\text{C}_7\text{-H}$), 8.15 (1H, d, $J=9$ Hz, $\text{C}_8\text{-H}$), 4.69 (2H, q, $J=7$ Hz, NCH_2CH_3), 1.48 (3H, t, $J=7$ Hz, NCH_2CH_3).
2d	(b): 9.00 (1H, s, $\text{C}_2\text{-H}$), 8.23 (1H, d, $J=2$ Hz, $\text{C}_5\text{-H}$), 7.86 (1H, dd, $J=8.5, 2$ Hz, $\text{C}_7\text{-H}$), 4.63 (2H, q, $J=7$ Hz, NCH_2CH_3), 3.39 (4H, distd. q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$), 1.48 (3H, t, $J=7$ Hz, NCH_2CH_3), 1.17 (6H, t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$).

a) Significant down-field shift was recognized among the corresponding proton signals by change of the solvent from $\text{DMSO}-d_6$, CDCl_3 and CD_3OD to $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$.

d) 上記 a) と同様の方法に従い, $3d^{14,15)}$ から mp 110.5—112.5° の無色結晶 (EtOH から再結晶) として **5d** を得た. 収率 95.2%. Anal. Calcd. $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 62.96; H, 7.23; N, 7.73. Found: C, 62.73; H, 7.45; N, 7.77.

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1695, 1655. NMR (δ in $\text{DMSO}-d_6$): 10.73 (1H, d, $J=14$ Hz, $\begin{array}{c} \text{HN} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \end{array}$), 4.23, 4.15 (each 2H, q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$), 3.92 (4H, q, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$), 1.27, 1.25 (each 3H, t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$), 1.11 (6H, t, $J=7$ Hz, $2 \times \text{CONCH}_2\text{CH}_3$).

15) a) H. Wenker, *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 1081 (1938); b) 高橋西蔵, 里田 勲, 福井富次郎, 松尾義治, 薬誌, **80**, 1579 (1960).

Ethyl 6- および 7-Carbamoyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylate (6a, 6b, 6c および 6d) 5 を 10—20 倍量の diphenyl ether に懸濁し油浴中 250—280° で 10—25 min 加熱。放冷後、*n*-hexane を加え析出する結晶をろ取し、再結晶によって精製、Table I に示す結果を得た。

6- および 7-Carbamoyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic Acid (8a,¹⁶⁾ 8b, 8c および 8d) 6 10 mmol, NaOH 70—80 mmol, EtOH 40—70 ml および 水 20—35 ml の混合物を沸騰水浴上 0.5—1.0 hr 加熱。EtOH を留去し、得られる残留液を水で希釈後、ろ過。ろ液を酢酸で中和し、生成した結晶をろ取し再結晶によって精製、Table I に示す結果を得た。

Ethyl 6- および 7-Carbamoyl-1-ethyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylate (7a, 7b, 7c および 7d) 6 10 mmol, K₂CO₃ 30—70 mmol, EtI 60—100 mmol および DMF 20—40 ml の混合物を 70—85° で 3—4 hr 加熱下攪拌。冷後、水を加え CHCl₃ 抽出。抽出液を水洗、乾燥 (Na₂SO₄) 後、溶媒を留去。残留固形物を再結晶によって精製、本法に従って Table I に示す結果を得た。

6- および 7-Carbamoyl-1-ethyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic Acid (2a, 2b, 2c および 2d) 化合物 7 について NaOH, EtOH および水を用い、化合物 6 の加水分解と同様な反応操作を行ない、Table I に示す結果を得た。

謝辞 本研究に際し元素分析を担当された東北大学薬学部中央分析室の方々に深謝致しますと共に、グレン製薬株式会社、柳沢 昭社長および高木 修研究開発本部長の御協力にお礼申し上げます。

16) 化合物 (8a) は文献 7c) において、本報とは異なった方法によって合成され、mp 307—308° (dec.) と報告されている。

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
98 (9) 1296—1299 (1978)

UDC 577.155.02 : 543.544.2.062

高速液体クロマトグラフィーによるアンジオテンシン I-変換酵素の迅速定量法¹⁾

永松淳雄, 添田泰司, 井ノ口仁一

福岡大学薬学部²⁾

Rapid Estimation of Angiotensin I-Converting Enzyme Activity by High-speed Liquid Chromatography¹⁾

ATSUO NAGAMATSU, SHINJI SOEDA and JIN-ICHI INOKUCHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University²⁾

(Received March 3, 1978)

Activity of angiotensin I-converting enzyme [EC 3.4.15.1] was assayed by chromatographical separation of the synthetic substrate (Bz-Gly-Gly-Gly or Bz-Gly-His-Leu) and the cleaved product (Bz-Gly) using high-speed liquid chromatography (HLC). Bz-Gly from each unhydrolyzed substrate was separated on the column of Zipax SAX (50 cm × 2.1 mm i.d.), and with 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 6.27) as eluant. In this condition, 1.3×10^{-4} to 2.4×10^{-3} units of the enzyme activity was measurable when Bz-Gly-Gly-Gly was used as the substrate, and 3.3×10^{-4} to 6.0×10^{-3} units of the activity was assayed with Bz-Gly-His-Leu as the substrate.

Keywords—high-speed liquid chromatography; angiotensin I-converting enzyme; Zipax SAX; hippuric acid; benzoylglycylglycylglycine; benzoylglycyl-L-histidyl-L-leucine

Angiotensin I-converting enzyme (以下 ACE と略す) の定量法に関しては、バイオアッセイの他に Z-Phe-His-Leu,^{3a)} Bz-Gly-His-Leu,^{3b)} Bz-Gly-Gly-Gly^{3c)} などのトリペプチド誘導体を基質とし、その水解物を蛍光測

1) 日本薬学会九州支部第 105 回例会で発表, 熊本, 1977 年 12 月。

2) Location: 11 Nanakuma, Nishiku, Fukuoka.

3) a-d) 次のように略す: Z, benzyloxycarbonyl; Bz, benzoyl.