

[薬学雑誌]
YAKUGAKU ZASSHI
89 (8) 1158-1162 (1969)

UDC 615.277.4 : 547.556.3.07 : 546.11.02.3

発がん性アゾ色素の研究(第1報) 特定位を三重水素標識したアゾ色素の合成¹⁾馬場茂雄, 森 幸雄, 岩尾 操,^{2a)} 岩原滋利^{2b)}東京薬科大学,^{2a)} 陸上自衛隊衛生学校^{2b)}

Studies on Carcinogenic Azo Dyes. I. Synthesis of Azo Dyes labeled with Tritium at the Specific Position

SHIGEO BABA, YUKIO MORI, MISAO IWAO,^{2a)} and SHIGETOSHI IWAHARA^{2b)}Tokyo College of Pharmacy,^{2a)} Medical School of Self-Defence Force^{2b)}

(Received March 4, 1969)

The methods for labeling of 4-dimethylaminoazobenzene (DAB) and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) with tritium at the specific position were studied. 2-,3-,³H-Dimethylaniline, ³H-aniline, and 3-methyl-5-³H-aniline were obtained by the decomposition of the lithium derivatives with tritiated water or by catalytic hydrogenation of brominated derivatives with tritium. By choosing one of these labeled bases as a starting material, 2-, 3-, and 3'-(5')-positions of DAB and 3'-Me-DAB can be tritiated. The labeled position was ascertained chemically by substitution with a nitro group and from infrared and nuclear magnetic resonance spectra of their deuterized substances. In nitration of 3-³H-dimethylaniline, some isotope effect was observed.

4-Dimethylaminoazobenzene および 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene(以下それぞれ DAB, 3'-Me-DABと略記)はラットに肝がんをつくるアゾ色素であることはよく知られている。DAB の同位元素による標識法としては、¹⁴C-aniline を原料にする方法,³⁾ メチル基を¹⁴C で標識する方法,⁴⁾ 交換法で generally に³H で標識した³H-aniline を原料にする方法,⁵⁾ 3 つの窒素原子を¹⁵N で別々に標識する方法⁶⁾ などが報告されている。しかし¹⁴C で標識する方法は、比放射能の高い標識 DABを得ることができないことおよび核種が非常に高価であることが短所である。また安定同位元素である¹⁵N による標識法は、検出限度が悪いので、生物学的トレーサー実験には、よい方法とはいえない。DAB をラットに投与すると、投与した DAB の1部は肝タンパク質と強固に結合し、いわゆる極性色素(polar dye)をつくる。⁷⁾ タンパク質は DAB のどの箇所に結合するかについて Miller 等は 3 位を主張しているが、寺山等は 4 位のアミノ基を介しているという説を最近提出した。極性色素の構造を明らかにすることは、DAB の発がん機構を解明するのに重要なことであるが、この問題の解決は、極性色素が極微量しか得られないために困難な課題である。特定位置を³H で標識した、比放射能の高い³H-DAB を用いれば、この問題についても新しい知見を期待できるので、DAB の 2, 3, 3' 位および DAB よりも発がん作用が強いといわれている 3'-Me-DAB の 2, 3, 5' 位を³H で標識する方法を検討した。

まず A 環の原料である dimethylaniline(以下 DMA と略記)を標識する方法を研究した。芳香核の特定水素を²H または³H で標識する方法⁸⁾としては、ジアゾニウム塩を²H または³H-次亜リン酸で還元する方法、グリニヤー試薬またはリチウム化合物を²H₂O または³H₂O で分解する方法がある。著者等は、³H-次亜リン

1) 日本薬学会第 87 年年会、京都、1967 年 4 月; 第 88 年会、東京、1968 年 4 月で発表。

2) Location: a) 4-chome, Kashiwagi, Shinjuku-ku, Tokyo; b) 1-chome, Ikejiri, Setagaya-ku, Tokyo.

3) O. Hromatka, L. Petzelbauer, E. Broda, *Mh. Chem.*, **88**, 317 (1957).4) H. Terayama, M. Ishidate, A. Hanaki, *Nature*, **184**, 1460 (1959).5) K.R. Ress, G.F. Rowland, J.S. Varcoe, *Brit. J. Cancer*, **19**, 903 (1965).6) W.S. Fones, J. White, *Arch. Biochem. Biophys.*, **20**, 118 (1949).7) J.A. Miller, E.C. Miller, G.C. Finger, *Cancer Res.*, **2**, 387 (1957); H. Terayama, M. Takeuchi, *Gann*, **53**, 293 (1962).

8) A. Murray, D.L. Williams, "Organic Synthesis with Isotopes," Part II, Interscience Publishers, Inc., New York 1958, p. 1437, p. 1683.

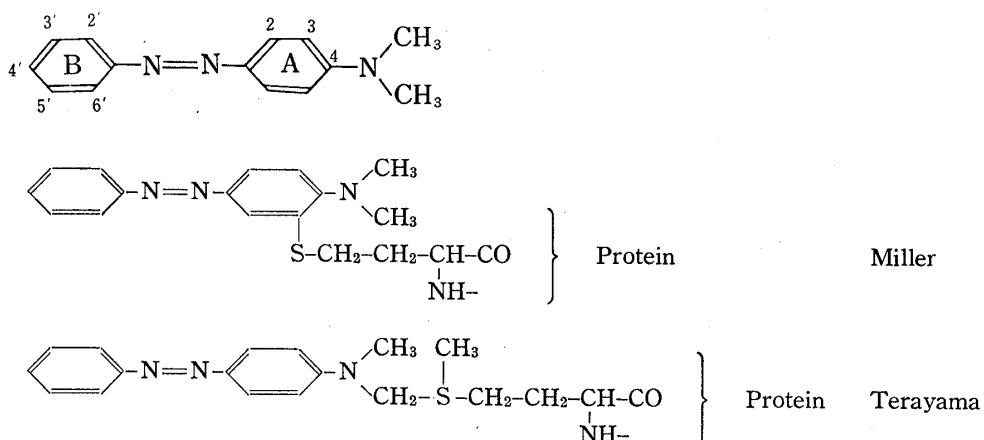


Chart 1. Structure of 4-Dimethylaminoazobenzene (DAB) and Its "Polar Dye"

酸で、3-nitroaniline の固体ジアゾニウム塩を還元することにより $3\text{-}^3\text{H}$ -nitrobenzene を合成する方法を検討したが、放射化学的収率が低く、本法を実用化するに至らなかった。次に、リチウム化合物を $^3\text{H}_2\text{O}$ で分解する方法を研究した。無水フタル酸との反応⁹⁾により、混在する第1および第2級アミンを除去した2-または3-bromodimethylaniline(以下 Br-DMA と略記) 0.01 mole を無水エーテルに溶かし、金属リチウムでリチウム化したのち、1Ci の $^3\text{H}_2\text{O}$ (0.2 ml) で分解することにより 2- または $3\text{-}^3\text{H}$ -DMA をそれぞれ 22%, 7% の放射化学的収率で得た。第3の方法として、Br-DMA を $^3\text{H}_2$ (Pd) で接触還元する方法を検討した。5—7 mmole の 2- または 3-Br-DMA を少量のエタノールに溶かし、Wilzbach の装置を用いて $^3\text{H}_2$ で還元すると、還元は容易に起こり、 ^3H -DMA が約 20% の放射化学的収率で得られた。

B 環の原料である aniline または toluidine の三重水素化は接触還元法によって行なった。3-Bromoaniline または 2-toluidine からアセチル化、プロム化、ニトロ化、脱アセチル化、脱アミノ化および還元の過程を経て合成した 3-methyl-5-bromoaniline を $^3\text{H}_2$ で接触還元するとそれぞれ $3\text{-}^3\text{H}$ -aniline または $3\text{-methyl-5-}^3\text{H}$ -aniline が、いずれも約 20% の放射化学的収率で得られた。

標識化合物の合成では、標識化合物の化学的純度のほかに放射化学的純度にも注意しなければならない。著者等が合成した標識化合物の化学的純度は、同じ条件で合成した非放射性試料の IR が標品に一致することから確めた。また放射化学的純度は、 ^3H -DMA, ^3H -aniline および $3\text{-methyl-5-}^3\text{H}$ -aniline についてラジオガスクロマトグラフ法により確めた。特定位置を放射性同位元素で標識する際には、標識化合物について標識位置を確認しておく必要がある。たとえば、epiandrost-5-en-17-one を $^3\text{H}_2$ で接触還元する場合、 ^3H は 5, 6 位の二重結合に付加するばかりでなく、7 位をも交換的に標識することを著者等¹⁰⁾ は経験した。また α -tosyloxyacet-anilide を Raney-Ni を用い、 $^2\text{H}_2$ または $^3\text{H}_2$ で還元するとアットランダムに標識された acetanilide が得られている。¹¹⁾ 上記の方法で標識した ^3H 標識化合物が目的の位置だけで標識されている証明は、重水素置換体の IR, NMR などの物理化学的な方法および三重水素置換体のニトロ基による置換反応によって得た。

^3H の場合と同じように、2-, 3- または 4-Br-DMA をリチウム化したのち重水で分解するか、Br-DMA を重水素化エタノール中¹²⁾ で $^2\text{H}_2$ で接触還元するとそれぞれ対応した ^2H -DMA が得られた。質量分析計でこれらの重水素化体の ^2H 含量を推定するといずれの方法でも計算量のほぼ 80% が重水素置換していることがわかつた。DMA および ^2H -DMA の IR は Fig. 1 に、NMR は Fig. 2 に示した。これらの場合で標識した場合、もし目的の箇所以外(特に Br の両オルト位)をも標識しているとすれば、重水素化体の IR, NMR はいずれも混合物のそれになるはずであるが、図示したように ^2H -DMA はそれぞれ個別の IR, NMR を示すことは、標識が一箇所でのみ行なわれていることを示唆するものである。

9) J.Y. & G.W. Johnson, U.S. Patent 333349 (1930).

10) H.J. Brodie, S. Baba, M. Gut, M. Hayano, *Steroids*, Dec, 659 (1965).

11) D. Jerina, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 3347 (1967).

12) A. Murray, D.L. Williams, "Organic Syntheses with Isotopes," Part II, Interscience Publishers, Inc., New York, 1958, p. 1335.

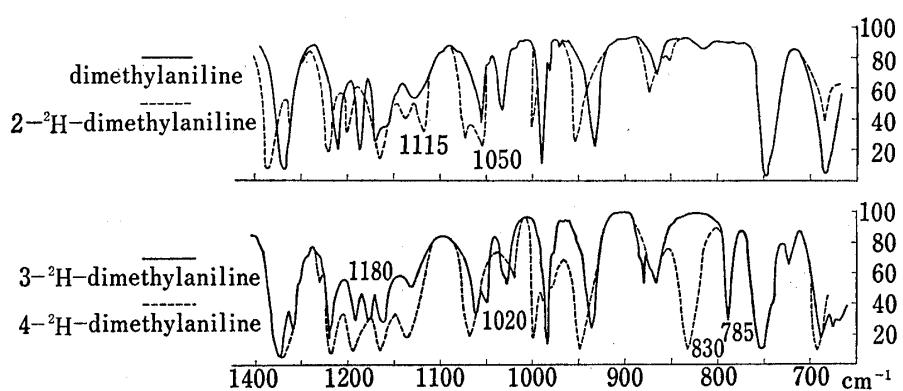


Fig. 1. Infrared Absorption Spectra of Dimethylaniline and ²H-Dimethylaniline (Liquid Film)

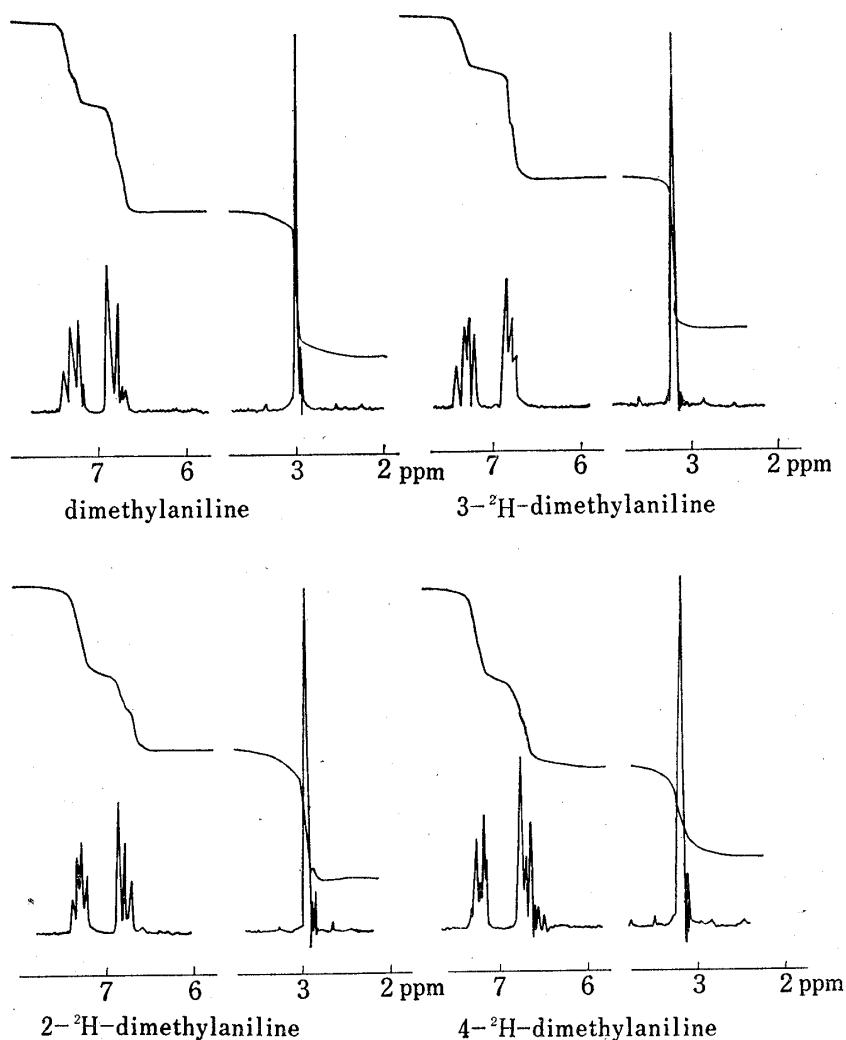
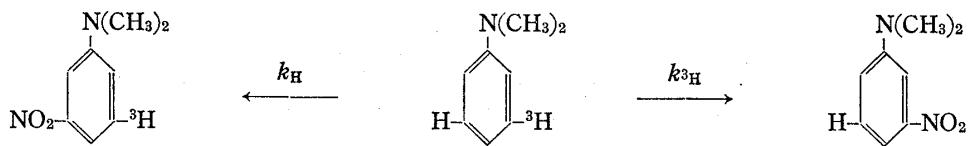


Fig. 2. Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Dimethylaniline and ²H-Dimethylaniline (CDCl₃)

リチウム体の ³H₂O 分解法または接触還元法によって ³H 標識した DMA を濃硫酸中、氷冷下にニトロ化すると 3- および 4-nitro-³H-DMA を与える。アルミナカラムを用いて両者を分離し、それぞれの比放射能を測定した。この実験結果の解釈では、軽水素と三重水素間の同位体効果を考慮しなければならないが、4-³H-DMA から得られた 4-ニトロ体では 100% の ³H が、また 3-³H-DMA から得られた 3-ニトロ体では 42—45% の

^3H が失なわれていることが明らかになった。Table I に 1 例として 3- ^3H -DMA について得られた実験結果を一括した。なおこの 42—45% という値は、



の反応において、 k_{H} が $k_{^3\text{H}}$ よりも大きい（同位体効果）ためであると考えられる。 ^2H -Toluene の混酸によるニトロ化反応を研究した Melander 等¹³⁾ は、ニトロ化の律速段階で同位体効果を報告しており、3- ^3H -DMA のニトロ化でも同様の結果が得られた。

TABLE I. Specific Radioactivity of 3- ^3H -Dimethylaniline and Its Nitro Derivate

Compound	Specific radioactivity (dpm/ μ mole)	Retention (%)
3- ^3H -Dimethylaniline	1.62×10^7	100
3-Nitrodimethylaniline	8.57×10^6	54.6
4-Nitrodimethylaniline	1.58×10^7	97.5

最後に 2 mmole の aniline または toluidine をジアゾ化したのち DMA とカップリングさせ、アルミナついでシリカゲルカラムおよびエタノールから再結晶することにより精製し、収率約 55% で DAB または 3'-Me-DAB を合成した。カップリングに用いる標識化合物をかえることによって、DAB または 3'-Me-DAB の ^2H , ^3H および ^3H (5') 位の水素を ^3H で標識することができた。標識化合物の放射化学的純度は、ペーパークロマトグラフ法¹⁴⁾ および薄層クロマトグラ法¹⁵⁾ によって確めた (Table II)。

標識に 1 Ci の $^3\text{H}_2\text{O}$ または $^3\text{H}_2$ を用いると、約 30 mCi/mmole の比放射能をもつ ^3H -標識アゾ色素が得られた。 ^3H -標識アゾ色素は液体シンチレーション計数装置で測定する場合、非常に強いカラーエンシングを示し、1 試料あたり、わずか 0.1 mg でも計数効率の著しい低下が認められるが、本法で得られる ^3H -標識アゾ色素は比放射能が充分高いので、たとえかなりの量のキャリヤーで希釈しても、液体シンチレーション計数装置で測定することができる。

TABLE II. R_f Values of ^3H -DAB^{a)} and ^3H -3'-Me-DAB^{b)}

Developing system	R_f values		
	^3H -DAB	^3H -Me-DAB	
Paraffin impregnated ^{c)}	MeOH-H ₂ O-AcOH (16:3:1)	0.39	0.48
	acetone-H ₂ O (7:3)	0.61	0.67
Silicagel plate ^{d)}	benzene-petroleum benzine (2:1)	0.40	0.45
	CHCl ₃ -MeOH (95:5)	0.94	0.95

^{a)} 2- and 3- ^3H -dimethylaminoazobenzene

^{b)} 5'- ^3H -3'-methyldimethylaminoazobenzene

^{c)} Toyo Roshi No. 53

^{d)} Wakogel B-10

実験の部

装置 1) UV: 日立 EPS-2 型, 2) IR: JASCO model IRDS 301, 3) NMR: J.N.M-4H-100, 4) Wilz-

13) L. Melander, *Nature*, **163**, 599 (1949); *Arkiv Kemi*, **2**, 213 (1950).

14) 日本薬学会編, “衛生試験法注解,” 金原出版, 東京, 1965, p.261; 藤井清次, 衛生試験所報告, **73**, 335 (1955).

15) M. Ishidate, M. Watanabe, S. Odashima, *Gann*, **58**, 267 (1967).

bach の装置：石井製作所製，5) 液体シンチレーション計数装置：Aloka LSC-501 型，6) ラジオペーパークロマトスキャナー：Aloka TRM-1 型，7) ラジオ薄層クロマトスキャナー：Aloka TLC-2B 型，8) Mass：日立 RMU-5G (SF)。

放射能の測定 液体シンチレーション計数装置による放射能の測定は、統計誤差が 1% 以下になるよう行なった。またカラークエンチングに起因する計数効率の低下を避け、測定誤差を少なくするため、着色試料は 1—2 mg を精秤し、ベンゼンに溶かし、その 1/10—1/100 をとって測定した。特に ³H-dimethylaniline (DMA) およびそのニトロ化体の測定では、カラークエンチングの強度をほぼひとしくするため、前者には非放射性 nitrodimethylaniline を添加した。ラジオペーパーおよびラジオ薄層クロマトスキャナーによる測定には、全スケール 1000 cpm または 3000 cpm で適当なスキャノグラムが得られる量をスポットした。

リチウム体の ³H₂O 分解による ³H 標識法 15 ml の反応容器中に無水エーテル 5 ml を入れ、容器内の空気を、5% ピロガロール溶液、硫酸および五酸化リンによって酸素と水分を除去した N₂ で置換する。リチウム細片 153 mg (22 mmole) をすばやく加えたのち、かきまぜながら bromodimethylaniline (Br-DMA) 1.96 g (10 mmole) のエーテル溶液を滴加する。ときどき上記の N₂ を通入して、かくはんを続けると反応液は白濁し、リチウム片は金属光澤を保ったまま漸次小さくなり、約 1 hr でほとんど消失する。ガラス沪過器を用いて速かに沪過する。多岐管を用いて、³H₂O 0.2 ml (11 mmole) を、2 本の側管をつけた内容 20 ml の反応容器に移し、5 ml の無水エーテルを加える。この中へ上記のリチウム体エーテル溶液を、N₂ 気流中かきまぜながら滴加する。分解が進むにつれて LiBr が析出してくる。分解が終ったら水を加えて LiBr を溶かし、エーテル抽出する。エーテル層を水洗後、K₂CO₃ で乾燥する。エーテルを留去したのち、残留物を減圧蒸留する。³H-DMA bp 59° (10 mm Hg)。必要ならば非放射性 DMA をキャリヤーとして加え、容器に付着している ³H-DMA を回収する。

リチウム体の ²H₂O 分解による ²H 標識法 ³H 標識の場合と同じようにリチウム化し、リチウム体を ²H₂O で分解することにより、2-, 3- および 4-²H-DMA を合成した。

接触還元法による ³H 標識法 プロムアミノ化合物 5—7 mmole を 4 ml の EtOH に溶かし、約 70 mg の Pd 黒を加え、Wilzbach の装置に接続し、³H₂+H₂ で接触還元する。還元は容易に進行し、約 2 hr で計算量の 110% の水素を吸収した。市販の ³H₂/Ci は、標準状態では 0.4 ml しかないので、H₂ で希釈して用いることになるが、初めから計算量の H₂ で希釈せずに、まず少量の H₂ で希釈した ³H₂ で接触還元し、あとから数回に分けて H₂ を補充するようにしたほうが放射化学的収率を高くすることができる。還元反応が終了後、沪過する。反応びん中を少量の EtOH で洗い沪過、沪液を合し、溶媒留去後、残留物をアルカリ性でエーテル抽出し、エーテル層を水洗後 K₂CO₃ で乾燥する。キャリヤーを適時加えてエーテルを留去後、目的物を減圧蒸留する。

接触還元法による ²H 標識法 Br-DMA 10 mmole を 4 ml の EtO²H¹²) に溶かし約 70 mg の Pd 黒を加え、Wilzbach の装置に接続し、²H₂ で接触還元した。

³H-4-Dimethylaminoazobenzene (DAB) および ³H-3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) Aniline 186 mg または toluidine 214 mg (いずれも 2 mmole) を NaNO₂ 溶液でジアゾ化したのち、氷冷下 DMA 242 mg (2 mmole) を加え、飽和 AcONa 溶液 (AcONa 8 g) をかきまぜながら少量ずつ加えると、カップリングが起こり、目的物が析出してくる。不溶物をエーテルで抽出、乾燥後、アルミナカラム (2.5×30 cm, CCl₄:CHCl₃ 4:1) ついでシリカゲルカラム (1×30 cm, ベンゼン) で溶出させ橙黄色部分を分取して精製したのち少量の EtOH から再結晶する。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ m μ (log ε): DAB 408 (4.396), 3'-Me-DAB 408 (4.403)。カップリングの化学的収率は約 55% であった。カップリングに用いる標識化合物を加えることによって 2,3 および 3' (5') 位の水素を ³H で標識した DAB または 3'-Me-DAB が得られた。

³H-DAB および ³H-3'-Me-DAB の放射化学的純度の確認 合成した各種の ³H-DAB および ³H-3'-Me-DAB の 1% EtOH 溶液をシリカゲルプレートまたは、5% 流動ペラヒン石油エーテル溶液に浸し風乾した沪紙にスポットし、Table II に示した展開溶媒で展開したのちラジオ薄層スキャナーまたはラジオペーパースキャナーで検索したところいずれの場合にも標準品と同じ Rf 値のところに单一の放射能ピークが得られた。

ニトロ基置換による標識位置の確認 比放射能 1×10^5 dpm/mg に希釈した 3- または 4-³H-DMA 約 3 mmole を H₂SO₄ 1.4 ml に溶かし、かきまぜながら氷冷下に H₂SO₄-HNO₃ (1:1) 0.4 ml を滴加する。1 hr 後反応液を氷水 10 ml で希釈したのち、NH₃ 水で赤色を呈するまで中和し、沪取する。沈澱物を水洗乾燥後、少量のベンゼンに溶かし、アルミナカラム (2×20 cm) に吸着させ、200 ml のベンゼン-ヘキサン (1:1) で展開後、ベンゼンで溶出、第 1 フラクション (黄赤色) 約 100 ml, 第 2 フラクション (赤色) 約 50 ml, 第 3 フラクション (淡黄色) 約 100 ml に分離する。さらに 100 ml の AcOEt-ベンゼン (1:4) で溶出し、第 4 フラクションを集め、第 1, 第 4 フラクションを、溶媒留去後少量の EtOH から比放射能が一定になるまで (3 回) 再結晶し、それぞれ 3-NO₂-DMA, 4-NO₂-DMA を得た。

謝辞 終りに本研究に対して、御助言を賜った東京薬科大学男子部長、長瀬雄三教授、御鞭撻いただいた陸上自衛隊関係上司に感謝いたします。またマススペクトルを測定していただいた東北大学中西研究室に深謝いたします。また実験に助力された高山秀樹君に感謝します。