

## ヘミンの酸化的開裂から生成する プロペントダイオペントの反応性と安定性

廣 田 和 弘

Reactivity and stability of propentdyopent produced by the oxidative cleavage of hemin

Kazuhiro HIROTA

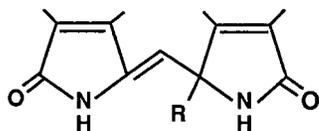
The water adduct of propentdyopent, which have two propionic acid groups and two methyl groups on two pyrrole rings and a hydroxyl group at the valley position, was prepared by the oxidation of hemin with hydrogen peroxide. Esterification of the two propionic acid groups and substitution of alkoxy group for the hydroxy group were studied to examine the reactivity of the adduct. The esterification took place with the substitution of methoxy group on treatment with a solution of 2% sulfuric acid in methanol at 60°C. The substitutions of methoxy and ethoxy groups were attained without any esterification on treatment with a solution 10% acetic acid in methanol at 80°C and a solution of 10% acetic acid in ethanol, respectively. Only esterification was performed on treatment with an ethereal solution of diazomethane. Hydrolysis of the ester occurred simultaneously with the substitution of hydroxyl group for methoxy group on standing with 0.5N hydrochloric acid at room temperature. Those compounds were purified by thin-layer chromatography and identified with mass and nmr spectra.

**Key Words :** Propentdyopent, pentdyopent, hemin, oxidation, dipyrrole

### 緒 言

プロペントダイオペント (PDP) <sup>1)</sup>は、図 1 に示すように Dipyrromethene 骨格をもつ構造である。このジピロール化合物の Valley 位 (図 1 の R 結合位置) に水とアルコールが付加した誘導体は、それぞれウォーター PDP とアルコール PDP と呼ばれ、生体成分との関連から研究されている化合物である。

PDP は、糞便の色素である Fuscine 中に存在す



R=OH: ウォーター PDP  
R=OR': アルコール PDP

図 1. プロペントダイオペント (PDP)

る単量体として、尿色素である Urochrome の構成成分として、胆汁色素排泄異常疾患の尿成分として、また新生児黄疸の光療法に発生するビリルビンの分解物質として生体成分に関連する化合物である。<sup>2-4)</sup>

このように、この化合物はヘモグロビンヘムの異化産生物質の 1 つであるところから、この化合物の合成、構造、反応性が研究されてきた。<sup>5,6)</sup> しかし、この化合物は必ずしも安定なものでなく、生体から分離するときその操作に用いる試薬や溶媒によって、特に Valley 位の置換基やピロール環に結合する残基が構造変化を受けやすい。このような PDP の安定性を検討することはヘムの異化に関する研究に重要で役立つものと考えられる。本論文では PDP として、ヘム (I) の過酸化水素酸化で比較的容易に得られるメタノール PDP ジ

メチルエステル<sup>5)</sup> (III, 2-[(3-(2-carboxyethyl)-1,5-dihydro-4-methyl-5-oxo-2*H*-pyrrole-2-ylidene)methyl]-2,5-dihydro-2-hydroxy-4-methyl-5-oxo-1*H*-pyrrole-3-propanoic acid) について, Valley 位の置換基の置換とピロール環に結合するプロピオン酸残基のエステル化およびエステル加水分解を行い PDP の安定性を検討したので報告する。

### 試薬と測定機器

試薬および溶媒は 1 級品であった。ジアゾメタンのエーテル溶液は, p-トルエンスルホン-N-ニトロソ-N-メチルアミドから発生するジアゾメタンをエーテルに溶解して調製したものである。溶媒の比は容積の比で, 硫酸のパーセント表示は, 重量%で示した。薄層クロマトグラフィー(TLC)は, Precoated plate (シリカゲル60, F-254, 厚さ0.25mm, Merck) を用いて行った。TLC の発色に用いる Stokvis 試薬は, ハイドロサルファイトナトリウムを20% KOH 溶液に飽和させて調製

した。

分取カラムクロマトグラフィーは, 高速液体クロマトグラフ (LC-5A, 島津製作所) のポンプと紫外吸収検出器 (280EL, 大岳製作所) を連結し, 280nm で検出して行った。カラムは, 中圧ガラスカラム(長さ47cm×内径1.4cm, 桐山社)に16g 充填剤 (Kiesel gel 60, 230~400mesh, Merck) を乾式で真空で吸引しながら詰めて製作したものであった。

プロトン核磁気共鳴スペクトル (NMR) 測定は, 内部標準として, テトラメチルシラン(TMS)を用いて, JEOL FX-100 (日本電子) で測定した。使用した溶媒中に含まれる水のケミカルシフト値は, 温度可変を行い, この値が移動することで確認した。EI 質量分析(70eV のイオン化エネルギー)では, 島津-LKB タイプ9000を用いて行った。

方法の項中反応番号は, 図2の反応番号を意味している。

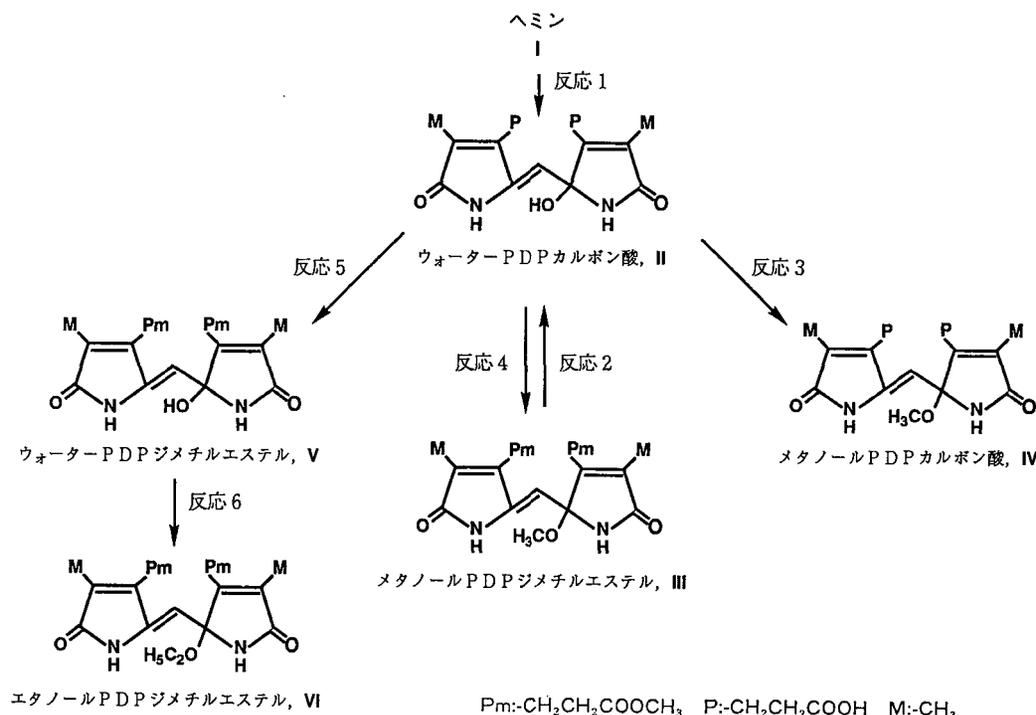


図2. PDP 類の変換反応

## 方 法

1. ヘミン(I)の酸化によるウォータ PDP カルボン酸(II)の生成 (反応 1)

I (1.0g) に濃アンモニア水 (1.0ml) を加え、さらに水 (170ml) 加えて溶かした。この溶液を 60℃ に加温して、35% 過酸化水素水 (25ml)、水 (25 ml) および濃アンモニア水 (1.5ml) からなる溶液を 20 分間かかって加え、60℃ で 1 時間加温した。

2 N 塩酸 (7 ml) を加え、沈殿する未反応のヘミン (茶褐色物質) を濾過して茶溶液を得た。減圧下で溶媒を留去し II を含む茶褐色残渣を得た。

2. ウォータ PDP カルボン酸(II)からメタノール PDP ジメチルエステル(III)への変換 (反応 4)

上記の II を含む茶褐色残渣に、2% 硫酸-メタノール (50ml) を加え、残渣を溶かした。得られた茶溶液を 60℃、1 時間加温しエステル化した。濃アンモニア水で中和し、溶媒を留去した。残渣に酢酸エチル (5 ml) を加えて 60℃ に加温しながら III を抽出した。さらにこの抽出操作を 5 回繰り返した。得られた抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒を留去し III を含む残渣を得た。

3. メタノール PDP ジメチルエステル(III)からウォータ PDP カルボン酸(II)への変換 (反応 2)

上記の III を含む残渣に、0.5N 塩酸に溶かし 1 時間、60℃ で加温し加水分解した。反応液の溶媒を減圧留去し、残渣を水に溶かし TLC (溶媒、ベンゼン：メタノール：酢酸=45：10：8) を行った。II のバンド (Rf=0.42) をかき取り、5% 酢酸-メチルエチルケトン溶液で抽出、溶媒を留去した。

4. ウォータ PDP カルボン酸(II)からメタノール PDP カルボン酸(IV)への変換 (反応 3)

I から得た II を含む茶褐色残渣に、10% 酢酸-メタノール溶液 (10ml) に溶かし、80℃、1 時間加熱した。反応液に酢酸エチルを加え、生じた塩化アンモニウム (白濁) を濾過し除去した。濾液の溶媒を減圧下留去し乾固し残渣を得た。残渣をメタノールに溶かし、この溶液を TLC (溶媒、クロロ

ホルム：メチルエチルケトン：酢酸=3：5：1) にかき取り、IV のバンド (Rf=0.50) をかき取り、5% 酢酸-メチルエチルケトン溶液で抽出し、溶媒を留去した。さらに精製するために、少量のメタノールに溶かし、TLC (溶媒、ベンゼン：メタノール：酢酸=45：8：8) にかき取り IV のバンド (Rf=0.54) をかき取り、展開溶媒で抽出し、溶媒を留去した。

5. ウォータ PDP カルボン酸(II)からウォータ PDP ジメチルエステル(V)への変換 (反応 5)

I から得た II を含む茶褐色残渣に、ジアゾメタン-エーテル溶液を加えて、室温 10 分間放置し、エステル化した。溶媒を留去し、得られた残渣を酢酸エチル (5 ml) に溶かし、16g の Kiesel Gel を詰めたガラスカラムにかけ、2 ml/min の流速からなる溶出液 (n-ヘキサン：酢酸エチル：メタノール=1：1：0.025) を用いて、中圧カラムクロマトグラフィーを行った。1 フラクションあたり 12 ml 集め、25 番から 35 番目のフラクションを集め濃縮した。酢酸エチルに溶かし、TLC (溶媒、ベンゼン：酢酸エチル=3：7) を行い、V のバンド (Rf=0.08) をかき取り、酢酸エチルで抽出し、溶媒を留去した。

6. エタノール PDP ジメチルエステル(VI)の合成 (反応 6)

上記で合成した V を、10% 酢酸-エタノール溶液に溶かし、80℃、1 時間加熱した。溶媒を減圧下留去した残渣を酢酸エチルに溶かし、TLC (溶媒、ベンゼン：酢酸エチル=3：7) にかけた。VI のバンド (Rf=0.28) をかき取り、酢酸エチルで抽出し溶媒を留去した。

## 結 果

PDP 類について確認試験を行った。

1. PDP 類の EI 質量分析と NNR 分析

V の EI 質量分析データ (表 1) では、分子イオンとそのフラグメントが観測され、NMR 分析 (表 2) では、ピロール環窒素に結合するプロトンおよびメチレンプロトンの一部を除くプロトンが観測された。IV の NNR 分析 (表 3) では、ピロー

ル環窒素に結合するプロトン以外のすべてのプロトンが観測された。VIのEI質量分析データ(表1)では、分子イオンとその3種のフラグメントが観測された。

表1. PDP類のEI質量分析

PDP	データ
V	392(M <sup>+</sup> , 32), 375(M-OH, 100)
VI	420(M <sup>+</sup> , 100), 405(M-CH <sub>3</sub> , 50), 391(M-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , 36), 375(M-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , 82)

表2. ウォーター PDP ジメチルエステル(V)のNMR(溶媒: CD<sub>3</sub>COOD)

Protons	Chemical shift (ppm)
Valley hydroxy	5.72(s)
Methylene	4.98(s)
Ester methyl	3.61(s)
Methylene in propionic acid*	2.36(s) and 2.63(s)
Aryl methyl	1.74(s) and 1.85(s)

sは、singletを示す。この他に、溶媒中のH<sub>2</sub>Oが2.8 ppm付近に、そして溶媒の不純物が2.05ppmに、試料の不純物が1.29ppmに現れた。\*メチレンの1部のシグナルは、溶媒の水のシグナルに隠されている。

表3. メタノール PDP カルボン酸(IV)のNMR(溶媒: CD<sub>3</sub>COOD)

Protons	Number of hydrogen	Chemical shift (ppm)
Methene	1H	5.14 (s)
Methoxy	3H	3.22 (s)
Methylene in propionic acid	8H	2.61, 2.65, 2.69 (m)
Aryl methyl	6H	1.87 (s) and 1.89 (s)

s, singlet; m, multiplet. この他に、溶媒の不純物として2.10ppm, 1.46ppmと試料の不純物として1.29 ppmのシグナルがあった。

## 2. PDP類のUVスペクトル

PDP化合物類のUV領域のスペクトル(表4)を測定した。その結果いずれも277~279nm付近

に最大吸収値があり、今までに報告されているPDP類のデータと近似するものであった。<sup>7)</sup>

表4. PDP類のUVスペクトル(溶媒: CH<sub>3</sub>OH)

PDP	最大吸収波長, nm	ミリモル分子吸光係数, mM <sup>-1</sup> · cm <sup>-1</sup>
II	278~279	未測定
III	278	29.8
IV	277~278	未測定
V	278~279	17.1

## 3. PDP類の薄層クロマトグラフィー(TLC)

5種のPDP類(II~VI)は、5種の展開溶媒を用いてシャープな分離を示した。観測されたそれぞれのRf値を表5に示した。

表5. PDP類の薄層クロマトグラフィー

PDP	展開溶媒	Rf-値
II	C*	0.42
III	A	0.23
	B	0.65
IV	C	0.58
	D	0.54
	E	0.50
V	A	0.08
	B	0.48
VI	A	0.28
	B	0.67

TLCは、Precoated plateを用いて行った、発色はStokvis試薬の噴霧によって行った。詳細は試薬と測定の間を参照。\*A, ベンゼン: 酢酸エチル=3:7; B, 酢酸エチル: 酢酸=20:1; C, ベンゼン: メタノール: 酢酸=45:10:8; D, ベンゼン: メタノール: 酢酸=45:8:8; E, クロロホルム: メチルエチルケトン: 酢酸=3:5:1。

## 4. PDP化合物類の特異的発色

ここに取り扱われたPDP類の全てが、PDPの特異呈色反応であるStokvis試薬に対して陽性を示した。また、TLCプレート上でも同じ反応を

示した。IIとIIIについて、この呈色溶液の可視吸収スペクトルを測定した。その結果、最大波長は、共に519~521nmにあった。TLCプレート上にUVランプ(250nm)を照射すると、すべてのPDP類は、青白い蛍光を示した。この現象もPDP化合物に特有な現象である。<sup>7)</sup>

### 考 察

ピロール環にメチル基とプロピオン酸残基をもつ5種のPDP(I~V)をつくった。これらのPDPの確認は、NNR, TLC, EI質量分析で行った。これらの分析結果はこれらの構造を支持するものであった。これは、既に報告されている値<sup>7)</sup>に一致した。PDP類の全てが、PDPの特異呈色反応であるStokvis試薬に対して陽性を示し、TLC展開後のプレート上にUVランプを照射すると、すべてのPDP類は、青白い蛍光を示した。これらの現象もPDP化合物に特有な反応である。<sup>7)</sup>

これらの化合物について、valley位置換とこのカルボキシル基のエステル化および加水分解は、どのような条件下で起こるかについて調べた。これらのValley位の置換基は、反応2, 3, 4, 6に見られるように、水、メタノールおよびエタノールとの加温により溶媒由来の水酸基、メトキシ基およびエトキシ基に容易に置換する。すなわち、水酸基(反応3, 4, 6)からアルコキシ基への変換は、低濃度の酢酸または硫酸の存在下アルコールと無水条件で加温するとメトキシ基およびエトキシ基置換する。ジアゾメタンの試薬によるエステル化条件では(反応5)、水酸基は変化を受けずエステル化反応が実行できる。しかし、ジアゾメタンの代わりに2%硫酸-メタノール溶液(反応4)を用い60℃加温して行くと、エステル化反応と同時にメトキシ基置換も受ける。このとき冷時(4℃)で行うと、メトキシ基置換は受けず、エステル化のみ実行できる。また、硫酸濃度を2%から1%に落とすと、エステル化のみ起こりメトキシ基変換は起こらない。一方、メトキシ基から水酸基への逆変換(反応2)は、0.5N塩酸(60℃)で実行できる。しかしこの場合はエステルの加水分解も同時に起こる。反応温度を37℃(1夜放置)

に下げると、IIと共に部分加水分解したモノエステルと思われる生成物が認められた。塩酸の濃度を0.1N(37℃, 1夜放置)に下げると加水分解が進まなかった。

IIIのエステルの加水分解を上述の塩酸以外にNaOH水溶液でも試みた。IIIに対してNaOH量をモル比で20倍量を用いて行くと、未反応のエステルが大部分残っていた。100倍量に上げると、目的物以外の多くの分解物が生成した。これらの分解物が生成するのは、生成するIIがアルカリに不安定のためであると考え、IIのアルカリに対する安定性を調べた。IIを室温、2 N NaOH中に放置した結果、1時間で、35%、24時間で、72%、そして48時間で82%分解した。従って、IIIのアルカリによる加水分解はIIのアルカリ不安定性から適当でないことが分かった。NaOHの代わりに炭酸ナトリウム水溶液(1 M, 60℃, 1時間)で加水分解を試み、原料は消失していたが、IIは得られなかった。

上述したように、IIは不安定で純粋に取り出すことが困難であることが分かった。TLCから分離したIIを酢酸の存在下、アセトンやメチルエチルケトンの溶媒と加温するだけで、黄色の分解物を含む種々の化合物に変化した。従って、IIからIII, IV, Vへの変換反応においても反応溶液には種々の成分を含みTLCによる精製が必要であった。UV測定はできたものの質量分析やNNRによる構造確認が出来なかった。

PDP類は、酸、アルカリ、アルコールなどの試薬に反応しその構造が変化することが分かった。これらの試薬はPDPの生体から分離精製や分析に汎用される試薬であるので留意すべきである。特に、valley位のメトキシ基は容易に酸性の水溶液に接触するとき水酸基に置換するので注意が必要である。今後はPDP類のこれらの反応を定量的に検討することが課題となる。

### 文 献

- 1) Dolphin D. (ed.): The porphyrins, Vol.6. Academic Press. New York and London. 574-577, 1979.
- 2) Berk P. D., Berlin N. I. (eds.): Chemistry and

- physiology of bile pigments. NIH, Washington, D. C. 455, 1977.
- 3) Gilbertsen A. S., Hawkinson V., Lowry P.T., Watson C. J.: Studies of the dipyrromethene ("Fuscin") pigments, Part I and II. J. Clin. Invest. 38 : 1166, 1959.
  - 4) Hsia D. Y-Y., Jackson C. (eds): Bilirubin metabolism of the newborn. Williams and Wilkins Co. Baltimore. 1970.
  - 5) 廣田和弘：ヘミンの酸化的開裂によるプロペントダイオペントの合成.  
岡山大学医療技術短期大学部紀要, 2 : 39-43, 1991.
  - 6) Schaefer W. H., Harris T. M., Guengerich F. P.: Characterization of the enzymatic and nonenzymatic peroxidative degradation of iron porphyrins and cytochrome p-450 heme. Biochemistry 24 : 3254-3263, 1985.
  - 7) Guengerich F. P.: Destruction of heme and hemo-proteins mediated liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase. Biochemistry 17 : 3633-3639, 1978.