

Title	イソキサゾール-3-カルボン酸類の比色およびけい光定量法に関する分析化学的研究
Author(s)	梅田, 常二
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33097
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	梅 田 常 二
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 5 4 5 1 号
学位授与の日付	昭和 56 年 10 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	イソキサゾール-3-カルボン酸類の比色およびけい光定量法 に関する分析化学的研究
論文審査委員	(主査) 教 授 柘井雅一郎 (副査) 教 授 佐々木喜男 教 授 北川 勲 教 授 田村 恭光

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

イソキサゾール誘導体は、医薬品としても数多く見られるにもかかわらず、それらに対する定量法は、大部分、イソキサゾール環上の置換基に着目した方法であり、選択性に乏しい欠点がある。

著者は、イソキサゾール-3-カルボン酸類の熱分解による脱炭酸生成物である β -ケトニトリルを、ベンズアルデヒドあるいは、その誘導体との Knoevenagel 縮合反応により、アシルシナモニトリル誘導体に導く同定法^{1,2)}に着目し、ベンズアルデヒド誘導体として、p-dimethylaminobenzaldehyde (DABA) を用い、イソキサゾール-3-カルボン酸として、5-methyl-3-isoxazole-carboxylic acid (MIA) および、5-phenyl-3-isoxazolecarboxylic acid (PIA) を例にとり、これらの Chart 1 の反応を利用する特異的な比色定量法を設定した。

さらに、医薬品の perisoxal (II) 並びに、薬理活性を有する。N-[(dimethyl-amino) carbonyl]-5-methyl-3-isoxazolecarboxamide (III) および、3-(2-oxazolin-2-yl)-5-methylisoxazole (IV) の分析への、本定量法の応用について検討した。

次に、Chart 1 の反応を利用した、イソキサゾール-3-カルボン酸に対する、より高感度かつ特異的な定量法を開発すべく、種々のアルデヒド試薬について検討した結果、サリチルアルデヒド類が、ベンゾイルアセトニトリルと反応し、けい光性物質を与えることを見出した。これらのけい光性物質は、いずれも単なる Knoevenagel type の縮合物ではなく、これから環を形成した3-ベンゾイルクマリン誘導体であることを明らかにした。(Chart 3) 単離した3-ベンゾイルクマリン類のけい光特性を比較検討した結果、PIAのけい光量の目的には、3-benzoyl-5,6-benzocoumarin (BBC) に誘導

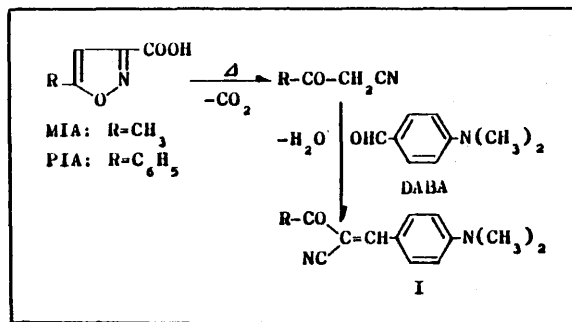


Chart 1

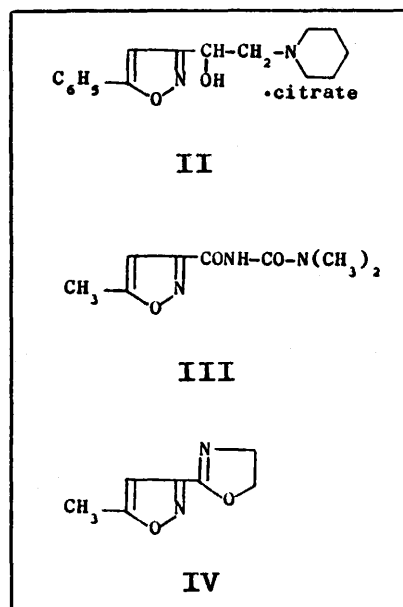


Chart 2

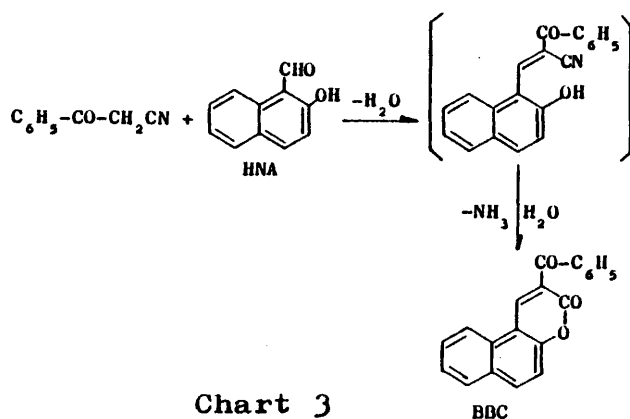


Chart 3

することが最も適していたので、これに誘導し得る試薬として、2-hydroxy-1-naphthaldehyde (HNA) を用い、けい光定量法を設定した。

さらに、血漿中の perisoxal の分析への本けい光定量法の応用について検討した。

Chart 1 に示した Knoevenagel 縮合反応は、エールリッヒの呈色反応として、活性メチレンの分析に広く応用されていることから、その呈色反応機構を明らかにすることは、分析化学的にも意味のあることと考えられる。著者は、呈色反応機構との関連から、呈色物質および、その関連物質の加水分解機構の速度論的解明を試みた。

呈色物質 I のように、電子求引性グループにより活性化された electrophilic olefin の炭素-炭素二重結合に対する求核攻撃に関して、これまでに多くの報告が認められ、Patai および Rappoport³⁾ による総説が報告されている。

しかしながら、XYC=CHAr のような electrophilic olefin に対する、活性グループ、X、Y の相対的な活性値を評価する方法は、十分に確立されたとは云えない現状である。^{4,5)}

いくつかの活性メチレン、XYCH₂ の p-ジメナルアミノベンジリデン誘導体 XYC=CH-C₆H₄-N(CH₃)₂ (I) のアルカリ加水分解における水酸イオンの求核攻撃の速度と、I の共役酸の解離定数 Ka との関係に興味をもち、X、Y の相対的な活性値を評価するパラメーターとしての Ka の有用性につ

いて検討した。

一方、このような electrophilic olefin に対するベンジリデン part の置換基効果については、多くの報告が認められ、Rappoport および Ladkani⁶⁾ は、その詳細な解析結果を報告している。

しかしながら、多くの報告は、求核攻撃の過程に関するものであり、一方、付加中間体からの分解の過程に対する置換基効果に関しては、ほとんど報告されていない。

活性グループ、X、Y をベンゾイルおよび、シアノ基に固定し、ベンジリデン part の置換基を変えた、置換 α -ベンゾイルシナモニトリル誘導体の加水分解機構の速度論的解明を試み、その置換基効果について考察した。

第 I 章 イソキサゾール-3-カルボン酸類の比色および、けい光定量法

(1) 比色定量法⁷⁾

Chart 2 のイソキサゾール誘導体、III および、IV は、塩酸で加水分解することにより MIA に導き、また II は、クロム酸酸化による PIA に誘導した後、それぞれ、MIA および PIA に対する定量法を適用することができた。

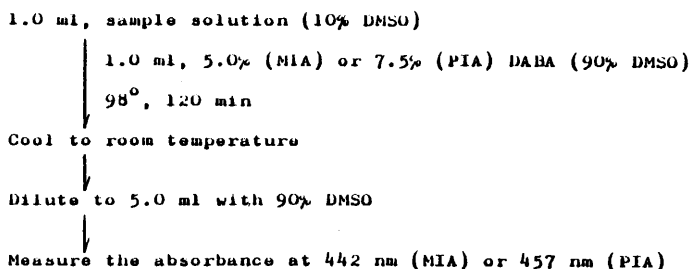


Chart 4. Analytical Procedure for MIA or PIA

1) 定量操作法

MIA および、PIA に対する定量条件について検討の結果、設定した定量操作法を Chart 4 に示す。

2) 吸収スペクトル

上記、定量操作法にしたがって得られる MIA および、PIA の反応液の吸収スペクトルは、Fig. 1 に示したように、それぞれ 442nm および 457nm に吸収極大波長を有する。

3) 5-イソキサゾールカルボン酸の影響

MIA および、PIA には、それらの合成過程の副生物として、対応する 5-イソキサゾールカルボン酸が混入しやすい。Table I に例示したように、3-phenyl-5-isoxazolecarboxylic acid の共存す

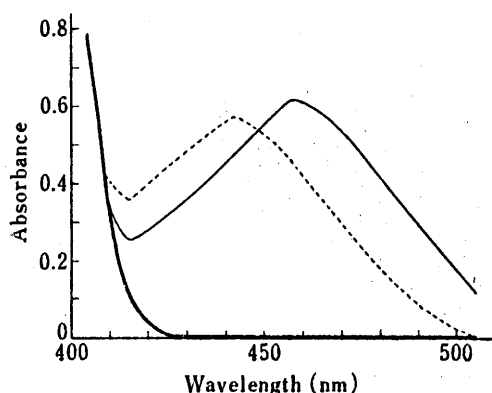


Fig. 1. Absorption Spectra of the Colored Solution and Blank Solution

..... : MIA (11.0 µg/ml),
— : PIA (22.0 µg/ml),
— : reagent blank.

Table I. Determination of PIA in the Presence of Its 5-Carboxylic Isomer

No.	Added (μg)		Found (μg)
	Isomer	PIA (x)	PIA (y)
1	12.63	3.56	3.64
2	12.63	7.13	6.87
3	12.63	10.69	10.70
4	12.63	14.25	14.00
5	7.90	17.82	17.56
6	6.32	21.38	21.25
7	3.16	24.94	25.67

Regression equation: $y=1.0195x-0.289$, $s=0.35$.

Table II. Concentration Range and Reproducibility of Color Development

compound	concentration range	added	found	(n)	C.V.
	($\mu\text{g}/\text{ml}$)	($\mu\text{g}/\text{ml}$)	($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
MIA	1.5 — 15.0	5.46	5.51 \pm 0.09	(10)	1.7
PIA	2.5 — 25.0	9.31	9.43 \pm 0.25	(10)	2.6
III	2.0 — 20.0	10.5	10.4 \pm 0.3	(10)	2.4
IV	1.5 — 15.0	7.27	7.32 \pm 0.13	(10)	1.8
II	5.0 — 50.0	21.4	21.2 \pm 0.7	(10)	3.4

る合成試料中のPIAに対し、本法を適用した結果、共存物の影響を受けずに定量できることを認めた。

4) 定量範囲定量精度

本定量法における定量範囲および定量精度を、Table IIに示した。

(2) けい光定量法⁸⁾

1) BBCのけい光特性

Table IIIに示したように、種々の溶媒中におけるBBCのけい光特性について比較した結果、溶媒の極性が増加するにつれてBBCのけい光強度は増加し、けい光極大波長は、他のクマリン類同様^{9,10)} red shiftすることが認められた。また、水-エタノールあるいは、水-DMSO中の水の割合が増加するにつれて、BBCの励起および、けい光極大波長は、共にred shiftし、そのけい光強度は著しく増加することが認められた。

3-1300ng/mlのBBCの20%DMSO溶液に対し、その濃度とけい光強度の間に良好な直線関係が成立することを認めた。

2) 定量操作法

PIAに対する定量条件について検討の結果、設定した定量操作法をChart 5に示す。

3) けい光スペクトル

上記、定量操作法にしたがって得られるPIAの反応液の励起および、けい光スペクトルは、Fig. 2に示したように、BBCの20%DMSO溶液のスペクトルとよく一致することが認められた。

4) 血漿中の perisoal の定量

人血漿中の perisoal をジクロロメタンで抽出し、抽出液を clean up した後、比色法の場合同様、クロム酸酸化して PIA に導き、その後、上記 PIA に対する定量操作法を適用することにより、血漿中の perisoal を定量することができた。

Table III. Fluorescence Properties of 3-Benzoyl-5,6-benzocoumarin in Various Solvents

Solvent	Excitation maximum (nm)	Emission maximum (nm)	RFI ^{a)}
Ethyl acetate	375	444	16
Benzene	380	450	17
Acetone	374	454	27
1,2-Dichloroethane	384	460	44
Chloroform	382	452	63
MeOH	378	470	307
EtOH	378	461	126
90% EtOH	380	465	359
70% EtOH	380	470	712
50% EtOH	380	472	894
30% EtOH	382	478	1690
10% EtOH	382	483	2590
DMSO	378	462	126
90% DMSO	378	464	203
70% DMSO	380	471	521
50% DMSO	381	476	1300
30% DMSO	382	482	3500
20% DMSO	382	482	3960
10% DMSO	384	484	4540
5% DMSO	384	484	5110
1% DMSO	384	484	5930

a) Relative fluorescence intensity.

1.0 ml, sample solution (10% DMSO)
 ↓
 1.0 ml, 1.0% HNA (90% DMSO)
 ↓
 120°, 30 min
 ↓
 Cool to room temperature
 ↓
 6 ml, ether
 ↓
 2 ml, pH 10.6 borate buffer
 ↓
 Shake for 1 min
 ↓
 Organic layer
 ↓
 Wash twice with 4 ml each of 50% DMSO-50% pH 10.6 borate buffer
 ↓
 Evaporate to dryness
 ↓
 Dissolve in 10.0 ml of 20% DMSO
 ↓
 Measure the fluorescence intensity at 480 nm with
 excitation at 380 nm

Chart 5. Analytical Procedure for PIA

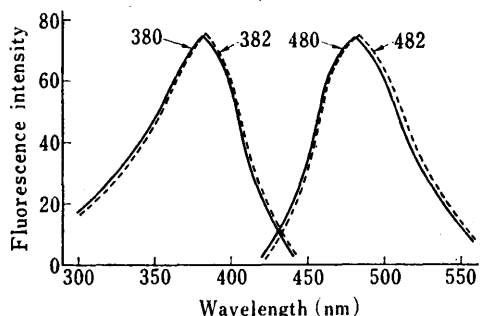


Fig. 2. Excitation and Emission Spectra of BBC and a Reaction Mixture of PIA with HNA

BBC: BBC was dissolved in DMSO-H₂O (2:8, v/v) at the concentration of 1.5×10^{-7} M.

---: excitation and emission spectra.

Reaction mixture: An aliquot (1.0 ml) of 1.5×10^{-4} M PIA solution was treated according to the standard procedure.

—: excitation and emission spectra.

なお、perisoxalは血漿からほぼ定量的に回収され、また、perisoxalの代謝物¹¹⁾の妨害もなく定量できることが認められた。

5) 定量範囲, 定量精度

本定量法における定量範囲および定量精度を、Table IVに示した。

Table IV. Concentration Range and Reproducibility of Fluorescence Development

sample	concentration range (ng/ml)	added (ng/ml)	found (n) (ng/ml)	C.V. (%)
PIA	35 — 350	180	179 _{±2} (10)	1.0
perisoxal in plasma	70 — 700	350	344 _{±11} (10)	3.1

第II章 呈色関連物質の加水分解

(1) 活性メチレンのp-ジメチルアミノベンジリデン誘導体の加水分解¹²⁾

1) pKaの測定

呈色物質および、その関連物質として、活性メチレン、XYCH₂とDABAとの縮合体、計13種(I_{a-m})を合成し、その共役酸の解離に対するpKa値を、30%エタノール中、酸度関数を用いて決定した。(Table V)

2) pH-rate profile

25°C, 30%エタノール中、I_{a-l}のアルカリ加水分解を行い、吸光度法により、Iの減少ならびに、DABAの生成に関する擬一次速度定数 k_{DC} および、 k_{FM} を求めた。

Fig. 3に示したように、化合物により2種類の異なったpH-rate profileが認められた。(type Aおよびtype B profile)。以後、type Aおよび、type B profileに属する化合物を、それぞれ、type Aおよび、type B化合物と総称する。(type A化合物: I_{a, b, n}; type B化合物: I_{c-g, i})。

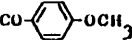
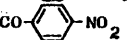

3) 反応中間体の蓄積

強アルカリ性領域におけるtype B化合物の加水分解においては、吸収スペクトルの経時変化および、反応速度の測定により、反応中間体が著しく蓄積されることを認めた。

4) 加水分解機構

Iのアルカリ加水分解に関する速度論の結果から、Scheme 1に示したように、Iのアルカリ加水

Table V. pK_a Values, Absorption Maxima, and Melting Points of Ia—m

Compd. No.	X	Y	pK_a	λ_{max} , nm	mp, °C
Ia	CN	CN	0.65 ± 0.06	442	178-179
Ib	CN	CONH ₂	1.64 ± 0.04	426	197-198
Ic	CN	COCH ₃	1.08 ± 0.05	450	108-109
Id	CN	COPh	0.91 ± 0.09	461	157-158
Ie	CN	CO-  -OCH ₃	1.09 ± 0.07	460	153-154
If	CN	CO-  -NO ₂	0.60 ± 0.11	476	233-235
Ig	COCH ₃	COCH ₃	2.65 ± 0.03	405	104-105
Ih	COCH ₃	COPh	2.43 ± 0.03	408	182-184
Ii	H	NO ₂	2.42 ± 0.02	464	186-188
Ij	CN	CO ₂ C ₂ H ₅	1.19 ± 0.05	436	127-128
Ik			0.96 ± 0.07	502	206-207
Il	CH ₃	NO ₂	3.08 ± 0.01	447	124-125
Im	CO ₂ C ₂ H ₅	CO ₂ C ₂ H ₅	2.64 ± 0.02	387	111-112

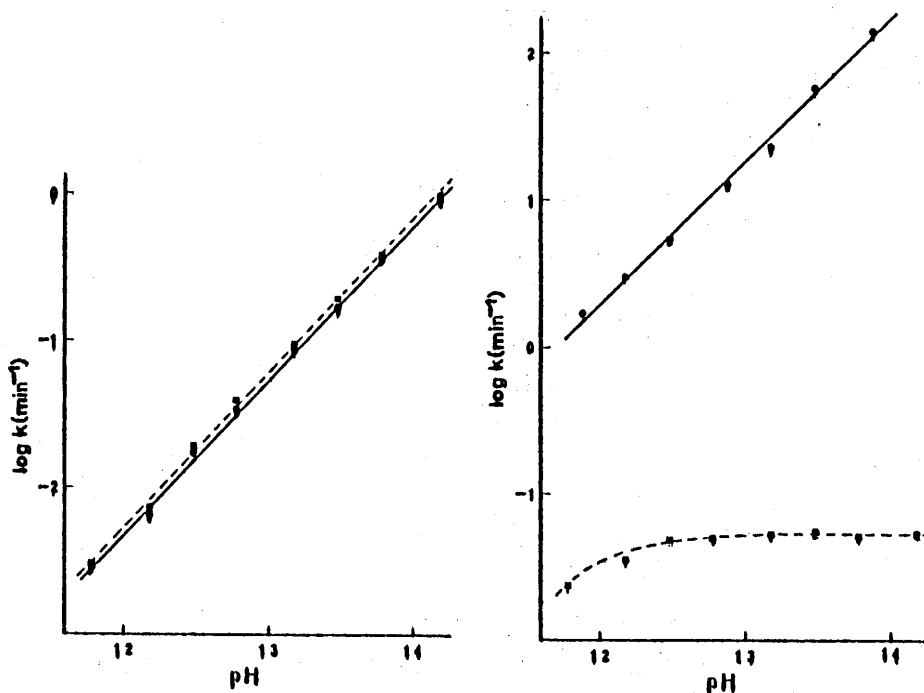
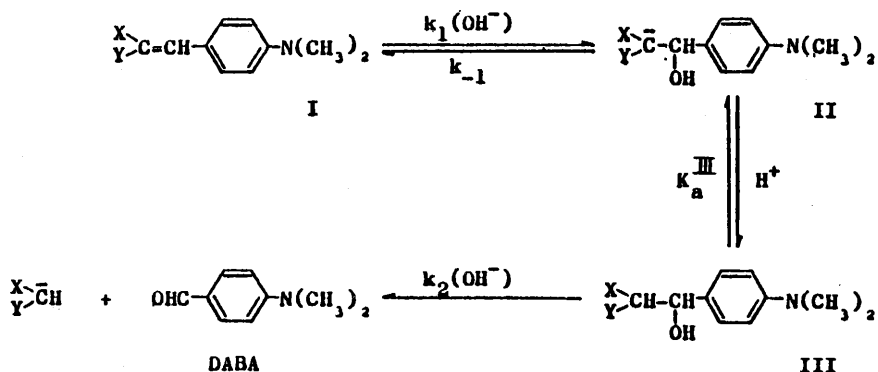


Fig. 3. Two Types of pH-Rate Profile for the Hydrolysis of I
 Left: for the hydrolysis of Ib (type A profile);
 Right: for the hydrolysis of Id (type B profile).

●—●: k_{DC} , ■—■: k_{FM} .

分解は、まず、カルバニオン中間体 II となり、II は III と早い平衡状態にあり、III から最終生成物に分解するものと考えられる。



Scheme 1

4)-1 type A化合物の加水分解

type A化合物のアルカリ加水分解においては、その減少速度がDABAの生成速度に等しいことから、中間体 II および III は定常状態にあると考えられ、 k_{FM} は(1)式で表わされる。ここで、 K_a^{III} は III の解離定数、 K_w は30%エタノール中における水のイオン積を、それぞれ表わしている。

$$k_{FM} = \frac{k_1 k_2 k_w a_{OH^-} / K_a^{\text{III}}}{k_{-1} + k_2 K_w / K_a^{\text{III}}} \quad (1)$$

もし、 $k_2 K_w / K_a^{\text{III}} \gg k_{-1}$ の仮定が成立するものとすれば、(1)式は(2)式のようにになる。しかしながら、この仮定は、Bernasconi等¹³⁾ によって報告された結果および、後述の速度パラメーターと pKa の値の間の直線自由エネルギー関係をよく説明することができない。

$$k_{FM} = k_1 a_{OH^-} \quad (2)$$

逆に、 $k_{-1} \gg k_2 K_w / K_a^{\text{III}}$ と仮定するとき、(1)式は(3)式となり、(3)式は、速度パラメーターと pKa 値の直線関係をよく説明することが認められた。

$$k_{FM} = k_1 k_2 K_w a_{OH^-} / k_{-1} K_a^{\text{III}} \quad (3)$$

4)-2 type B化合物の加水分解

type B化合物のアルカリ加水分解においては、中間体の蓄積が認められることから、I と II の間には速い平衡が成立しているものと考えられ、このとき k_{DC} および、 k_{FM} は、それぞれ、(4)、(5)式で表わされる。

$$k_{DC} = k_1 a_{OH^-} + k_{-1} K_a^{\text{III}} / (K_a^{\text{III}} + a_{H^+}) \quad (4)$$

$$k_{FM} = \frac{k_1 k_2 K_w a_{OH^-} / (K_a^{\text{III}} + a_{H^+})}{k_1 a_{OH^-} + k_{-1} K_a^{\text{III}} / (K_a^{\text{III}} + a_{H^+})} \quad (5)$$

Ⅲのような中間体の解離定数は、対応する活性メチレンの解離定数より大きく^{14, 15)} type B化合物の場合、対応する活性メチレンの解離に対する pK_a^{AM} 値は、Table VIに示したように最も大きいもので、 I_i の場合の10.21であるので、検討したアルカリ性領域 (pH10—14) では、 $K_a^{III} \gg a_{H^+}$ の条件が成立し、(4)、(5)式は、それぞれ、(6)、(7)式に簡略化される。

$$k_{DC} = k_1 a_{OH^-} + k_{-1} \quad (6)$$

$$k_{FM} = \frac{k_1 k_2 k_w a_{OH^-} / K_a^{III}}{k_1 a_{OH^-} + k_{-1}} \quad (7)$$

$k_1 a_{OH^-} \gg k_{-1}$ が成立するような強アルカリ性領域では、(6)、(7)式はさらに(8)、(9)式に簡略化される。(8)、(9)式は、強アルカリ性領域における pH-rate profileをよく説明することが認められた。

$$k_{DC} = k_1 a_{OH^-} \quad (8)$$

$$k_{FM} = k_{limit} = k_2 K_w / K_a^{III} \quad (9)$$

また、 $k_{-1} \gg k_1 a_{OH^-}$ が成立するような弱アルカリ性領域では、(7)式は、type A化合物の場合の(3)式に一致し、(3)式は、弱アルカリ性領域における pH-rate profileをよく説明することが認められた。

したがって、 I_{a-i} のすべての化合物のアルカリ加水分解における DABA の生成速度定数、 k_{FM} は(7)式で表わすことができる。

4)-3 速度パラメーター

(7)式から、 a_{OH^-} / k_{FM} と a_{OH^-} の間には、(10)式の直線関係が成立する。

$$a_{OH^-} / k_{FM} = (K_a^{III} / k_2 K_w) a_{OH^-} + k_{-1} K_a^{III} / k_1 k_2 K_w \quad (10)$$

ここで、 $p = K_a^{III} / k_2 K_w$ 、 $q = k_{-1} K_a^{III} / k_1 k_2 K_w$ とすると、

$$p/q = k_1 / k_{-1} = K \quad (11)$$

type B化合物については、(8)式から得られる k_1 の値を(11)式に代入することにより k_{-1} の値を算出することができる。

このようにして得られた速度パラメーター (k_1 , k_{-1} , K , P , $1/q$) は、 pK_a および、 pK_a^{AM} 値と共に Table VI にまとめて示した。

5) 活性グループ X, Y の置換基効果

5)-1 $\log k_1$ vs pK_a

Fig. 4 に示したように、 $\log k_1$ を pK_a に対してプロットすると、 I_i の場合を除き、勾配 -1.42 ± 0.06 ($n=5$) の直線関係が成立する。

このような直線自由エネルギー関係は、また、Patai および Rappoport¹⁶⁾ によって報告された活性メチレンの p -メトキシベンジリデン誘導体に対する水酸イオンの求核攻撃の 2 次速度定数に対しても成立することが認められた。

Table VI. Rate Parameters for the Hydrolysis of I

Compd. No.	p (min)	1/q (min ⁻¹ M ⁻¹)	k ₁ (min ⁻¹ M ⁻¹)	k ₋₁ (min ⁻¹)	log K (M ⁻¹)	pK _a	pK _a ^{AM} (lit.)
Ia	nearly 0	54.6				0.65	(11.19) ^a
Ib	nearly 0	1.74				1.64	
Ic	3.13	29.1	487	5.35	1.96	1.08	
Id	18.3	24.4	555	1.25	2.65	0.91	(7.77) ^b
Ie	7.60	14.3	290	2.65	2.04	1.09	8.52
If	169	84.8	1730	0.121	4.16	0.60	6.30
Ig	13.8	0.381	2.12	0.406	0.72	2.65	9.13 (9.00) ^a
Ih	nearly 0	0.0320				2.43	9.03 (9.40) ^a
Ii	141	14.7	75.5	0.0364	3.32	2.42	(10.21) ^a

a) R.G. Pearson and R.L. Dillon, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2439 (1953).

b) V. Pihl, H. Siilbek, T. Tenno, A. Ranne, and A. Talvik, *React. Sposobnost Org. Soedin., Tartu. Gos. Univ.*, **5**, 27 (1968) [*C.A.*, **69**, 100208s (1968)].

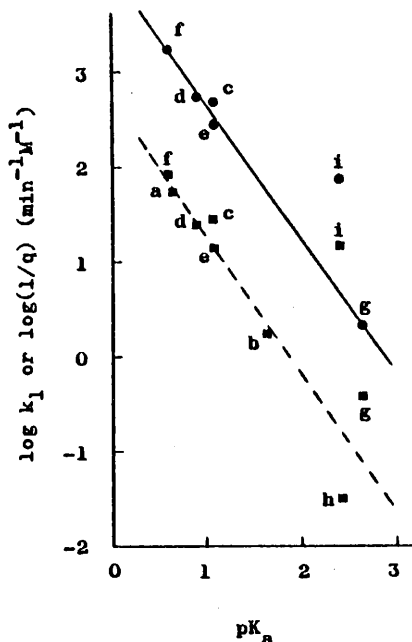


Fig. 4. Plots of $\log k_1$ or $\log(1/q)$ against pK_a

●—●: $\log k_1$ vs. pK_a ,
 ■-----■: $\log(1/q)$ vs. pK_a .

このことは、X、Yグループにより活性化された electrophilic olefin への求核試薬の攻撃に対する X、Yグループの相対的活性値を評価するパラメーターとして pK_a 値が有用であることを示唆するものと考えられる。

5)-2 $\log(1/q)$ vs pK_a

Fig. 4 に示したように、 $\log(1/q)$ を pK_a に対してプロットすると、I_d の場合を除き、勾配 -1.45 ± 0.20 ($n=8$) の直線関係が成立する。

$\log k_1$ vs pK_a および $\log(1/q)$ vs. pK_a の直線式の勾配が非常に近い値であることから、 $k_2/k_{-1}K_m$ 項に対する X、Yグループの置換基効果は、非常に小さいと考えられる。

5)-3 $\log k_{-1}$ or $\log(1/p)$ vs pK_a^{AM}

構造の類似した置換ベンゾイル誘導体 I_{a-f} について、 $\log k_{-1}$ あるいは、 $\log(1/p)$ を pK_a^{AM} に対してプロットすると、Fig. 5 に示したように、それぞれ、勾配 0.61 あるいは、0.60 の直線関係の成立することが認められた。

置換ベンゾイル誘導体に関しては、 $pK_a^{AM} - pK_a^{III}$

= constantと仮定すれば、 $\log k_{-1}$ vs pK_a^{AM} の直線関係は、 $\log k_{-1}$ と pK_a^{AM} の関係 (勾配=0.61)を、また、 $\log(1/p)$ vs pK_a^{AM} の直線関係は、 $\log k_2$ と pK_a^{AM} の直線関係 (勾配=-0.40)を示すことになる。

このことは、炭素-炭素二重結合の形成過程 (k_{-1})あるいは、炭素-炭素結合の開裂過程 (k_2)に対する速度は、それぞれ、反応するカルバニオン (II)あるいは、生成するカルバニオン ($XY\bar{C}H$)の安定性と良い相関関係にあることを示している。

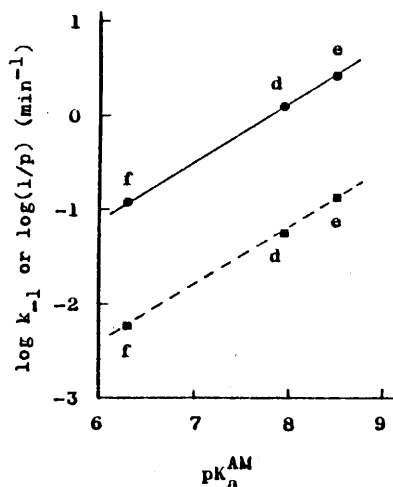


Fig. 5. Plots of $\log k_{-1}$ or $\log(1/p)$ against pK_a^{AM}
 ●—●: $\log k_{-1}$ vs. pK_a^{AM} ,
 ■-----■: $\log(1/p)$ vs. pK_a^{AM} .

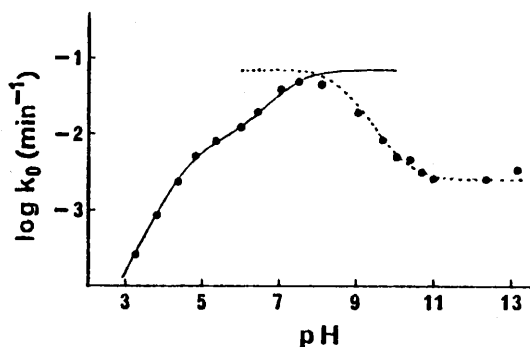


Fig. 6. pH-rate Profile for the Hydrolysis of α -Benzoylcinnamionitrile
 The solid line is calculated from Eq. (15) and the dotted line is from Eq. (13).

(2) 置換 α -ベンゾイルシンナモニトリル誘導体の加水分解¹⁷⁾

1) pH-rate profile

25°C, 30%エタノール中, pH 2—13の範囲で, 置換 α -ベンゾイルシンナモニトリル誘導体 (IV)の加水分解速度を測定した。

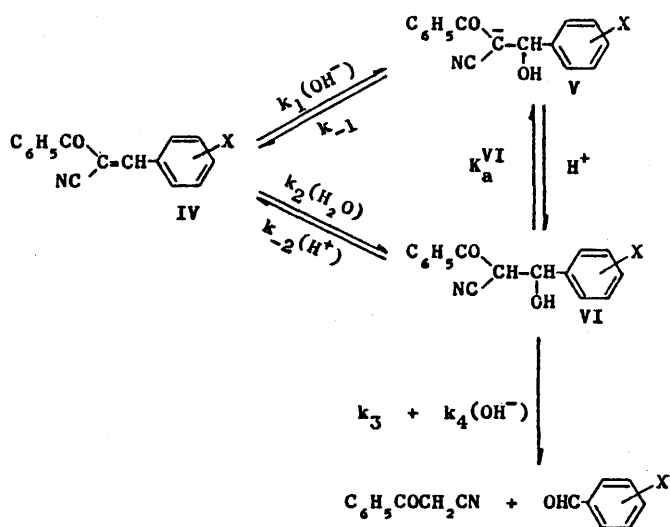
緩衝液濃度 0 に外挿して得られた見かけの擬一次速度定数 k_0 に対する pH-rate profile は, Fig. 6 に示したように, 中性付近で最大の速度のなり, 弱酸性領域でわずかに inflection を示す特徴を有している。

アルカリ性領域では, 電子供与性置換基による速度促進効果が認められ, また, I の type B 化合物の場合同様, 反応中間体の蓄積が認められた。

一方, 酸性および中性領域では, 電子求引性置換基による速度促進効果が認められ, また, IV の消失速度は, 最終分解物 (ベンゾイルアセトニトリルおよび, 置換ベンズアルデヒド) の生成速度と一致することが認められた。

2) 加水分解機構

速度論の結果から, IV の加水分解は Scheme 2 にしたがって進行するものと考えられる。



Scheme 2

2)-1 アルカリ性領域の加水分解

IVのアルカリ加水分解においては、中間体の蓄積が認められることから、IVとVの間には、早い平衡が成立しているものと考えられ、このとき k_0 は、(12)式で表わされる。ここで、 K_a^{VI} は、中間体VIの解離定数を表わしている。

$$k_0 = \frac{(k_1 a_{OH^-} + k_2) (k_3 + k_4 a_{OH^-}) a_{H^+} / (K_a^{VI} + a_{H^+})}{k_1 a_{OH^-} + k_2 + \{k_{-1} K_a^{VI} + k_{-2} (a_{H^+})^2\} / (K_a^{VI} + a_{H^+})} \quad (12)$$

pH 8—13のアルカリ性領域では、 $K_a^{VI} \gg a_{H^+}$ と考えられ、また、このpH領域では $k_1 a_{OH^-} \gg k_2$ 、 $k_{-1} K_a^{VI} \gg k_{-2} (a_{H^+})^2$ と仮定すると、(12)式は(13)式に簡略化される。

$$k_0 = \frac{k_1 K_w (k_3 + k_4 a_{OH^-}) / K_a^{VI}}{k_1 a_{OH^-} + k_{-1}} \quad (13)$$

さらに、 $k_1 a_{OH^-} \gg k_{-1}$ の仮定が成立するとすれば、(13)式は(14)式に簡略化される。

$$k_0 = k_3 a_{H^+} / K_a^{VI} + k_4 K_w / K_a^{VI} \quad (14)$$

(14)式における k_0 と a_{H^+} の間の直線式の勾配および、切片から、 k_3 / K_a^{VI} および、 $k_4 / K_w / K_a^{VI}$ の値を求めた。(Table VII)

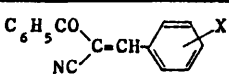
2)-2 酸性および中性領域の加水分解

酸性および、中性領域においては、IVの加水分解におけるその減少速度は、最終分解物の生成速度と一致することから、中間体Vおよび、VIは定常状態にあり、また、このとき $k_3 \gg k_4 a_{OH^-}$ が成立すると仮定すれば、 k_0 は(15)式で表わされる。

$$k_0 = \frac{(k_1 a_{OH^-} + k_2) k_3 a_{H^+}}{k_{-1} K_a^{VI} + k_{-2} (a_{H^+})^2 + k_3 a_{H^+}} \quad (15)$$

酸性領域においては、さらに、 $k_{-2} (a_{H^+})^2 + k_3 a_{H^+} \gg k_{-1} K_a^{VI}$ 、 $k_2 \gg k_1 a_{OH^-}$ が成立すると仮定すれば、

Table VII. Rate Parameters for the Hydrolysis of IV

	$10^3 k_2$ (min^{-1})	$10^7 k_2 k_3 / k_{-2}$ ($\text{min}^{-1} \text{M}$)	$10^{-7} k_3 / K_a^{\text{VI}}$ ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)	$10^3 k_4 K_w / K_a^{\text{VI}}$ (min^{-1})
p-N(CH ₃) ₂				55
p-OCH ₃	0.11	0.24	11	8.6
p-CH ₃	0.31	0.50	5.6	4.5
m-CH ₃	0.50	1.2	3.9	3.5
H	0.82	1.5	3.5	2.5
m-OCH ₃	2.0	2.2	2.1	1.8
p-Cl	3.0	4.0	1.1	1.5
m-Cl	7.6	10	0.60	0.90
m-CN	23	50	0.18	0.37
p-CN	23	48	0.26	0.40
m-NO ₂	32	59	0.15	0.32
p-NO ₂	38	71	0.17	0.33

(15)式は(16)式に簡略化される。

$$k_0 = k_2 k_3 / (k_{-2} a_H + k_3) \quad (16)$$

(16)式を(17)式のように変形し、 $1/k_0$ と a_H の間の直線式の勾配および、切片の逆数から、それぞれ $k_2 k_3 / k_{-2}$ および、 k_2 の値を求めた。(Table VII)

$$1/k_0 = k_{-2} a_H / k_2 k_3 + 1/k_2 \quad (17)$$

無置換体の加水分解については、Table VIIに示した速度パラメーターを用いて、弱酸性から中性領域にかけて、(15)式によく合うような k_1 および k_{-1} の値を、それぞれ見積ることができた。 $(k_1 = 1.6 \times 10^6 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}, k_{-1} = 2.8 \text{ min}^{-1})$

このようにして得られた k_1 および、 k_{-1} の値ならびに、Table VIIに示した速度パラメーターを用いて、(15)式から計算した無置換体の加水分解に対するpH-rate profileの理論曲線を、Fig. 6の実線で示し、また(13)式から計算した理論曲線を、同図の点線で示したように、それぞれ、酸性から中性領域および、アルカリ性領域における実測値(●)とよく一致することが認められた。

3) 置換基効果

3)-1 $\log k_2$ vs σ

Fig. 7に示したように、 $\log k_2$ vs σ のハメットプロットは、強電子求引性置換基(CN, NO₂)を除き、直線関係が成立することを認めた。 $[\rho_1(k_2) = 2.77, r = 0.994, n = 7]$ 。

強電子求引性置換基が、わずかに下にずれる理由は、cross conjugation¹⁸⁾に帰因するものと考えられる。

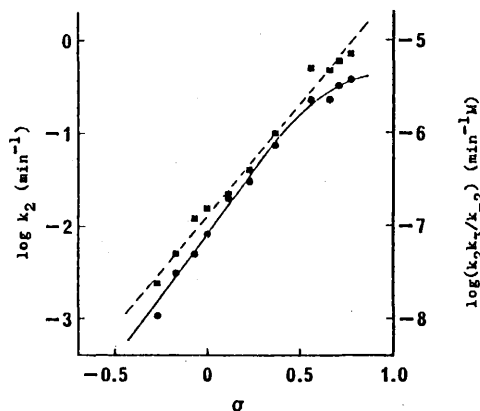


Fig. 7. Hammett Plots of $\log k_2$ or $\log(k_2k_3/k_{-2})$ against σ

●—●: $\log k_2$ vs. σ ,
 ■- - -■: $\log(k_2k_3/k_{-2})$ vs. σ .

3)-2 $\log(k_2k_3/k_{-2})$ vs σ

Fig. 7に示したように、 $\log(k_2k_3/k_{-2})$ vs σ のハメットプロットは、直線関係を与えることが認められた。 $[\rho_2(k_2k_3/k_{-2})=2.38, r=0.993, n=11]$ 。

3)-3 $\log(k_3/K_a^{VI})$ or $\log(k_4K_w/K_a^{VI})$ vs σ

Fig. 8に示したように、 $\log(k_3/K_a^{VI})$ あるいは、 $\log(k_4K_w/K_a^{VI})$ のハメットプロットは、いずれも、強電子求引性置換基 (CN, NO₂) を除き、直線関係が成立することを認めた。 $[\rho_3(k_3/K_a^{VI})=-1.89, r=0.994, n=7; \rho_4(k_4K_w/K_a^{VI})=-1.50, r=0.995, n=8]$ 。

VIのような中間体の解離定数に対する置換基効果は小さいと推定される¹⁹⁾ ので、 ρ_3 および、 ρ_4 の大きい負の伸は、 k_3 および、 k_4 過程の遷移状態において、VIの β -炭素上に δ^+ chargeが生成するような、かなりの炭素-炭素結合の開裂が起っていることを示唆している。

Fig. 8に示したハメットの直線関係から、強電子求引性置換基がはずれる理由については、以上に示す活性化パラメーターに基づき考察する。

4) 活性化パラメーター

Table VIIIには、 k_0 値がほぼ k_4K_w/K_a^{VI} に等しいと考えられるpH13において測定した、活性化パラメーターの値を示した。

強電子求引性置換基の場合、活性化エントロピーの値が、エンタルピー-エントロピー関係²⁰⁾ から推定される値より小さいことから、 k_4 過程の遷移状態において、その他の置換基の場合より、水酸イオンと、中間体VIのアルコール性水酸基との相互作用がより大きく、したがって、VIの炭素-炭素結合の開裂は、より少ないものと推定される。

すなわち、強電子求引性置換基の場合、 k_4 過程の遷移状態において、VIの水酸基の脱プロトン化と炭素-炭素結合の開裂とが協奏的に起ると考えられ、Fig. 9に示した斜線の点線を通して反応が進行

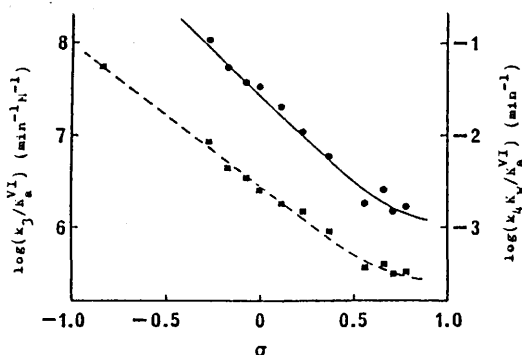


Fig. 8. Hammett Plots of $\log(k_3/K_a^{VI})$ or $\log(k_4K_w/K_a^{VI})$ against σ

●—●: $\log(k_3/K_a^{VI})$ vs. σ ,
 ■- - -■: $\log(k_4K_w/K_a^{VI})$ vs. σ .

Table VIII. Activation Parameters for the Hydrolysis of IV

Substituent (x)	ΔH^\ddagger (kcal/mole)	ΔS^\ddagger (e.u.)
	at 25 ^o	at 25 ^o
p-N(CH ₃) ₂	20.88	-2.73
p-OCH ₃	23.75	4.33
p-CH ₃	23.23	1.29
m-CH ₃	24.21	3.70
H	25.89	9.06
m-OCH ₃	25.95	8.42
p-Cl	26.42	9.89
m-Cl	27.30	11.22
m-CN	23.32	-3.48
p-CN	23.53	-2.93
m-NO ₂	22.76	-6.13
p-NO ₂	23.79	-2.25

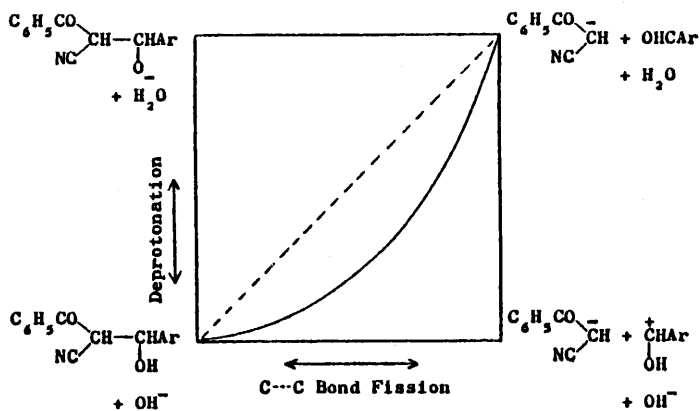


Fig. 9. Schematic Reaction Coordinate Diagram for the k_4 Process

The horizontal and vertical axes represent the amount of carbon-carbon bond fission of VI and that of deprotonation of the alcoholic hydroxy group of VI, respectively. The diagonal and curved lines show the reaction coordinate for the strongly electron-withdrawing substituents and that for the other compounds IV, respectively. The energy contour lines are omitted.

するものと考えられる。一方、その他の置換基の場合には、水酸基の脱プロトン化に優先して炭素—炭素結合の開裂が起ると考えられ、Fig. 9の曲線の実線を通して反応が進行するものと考えられる。

k_3 過程についても、 k_4 過程と同様な反応座標が考えられ、このような遷移状態構造の置換基による変化のために、Fig. 8のハメットプロットにおいて、強電子求引性置換基が、直線より上方にずれたものと考えられる。

結 論

1) DABAを用い、MIAおよび、PIAに対する新しい比色定量法を設定した。

本法は、それらの熱分解により生じる β -ケトニトリルのKnoevenagel縮合反応に基づくので、イソキサゾール環に特異的な比色定量法である点に特徴を有する。

2) HNAを用い、PIAに対する高感度かつ特異的なけい光定量法を設定した。

本法は、PIAの熱分解により生じるベンゾイルアセトニトリルのKnoevenagel縮合反応に続くクマリン環の形成に基づくので、比色定量法の場合より、さらに特異的かつ高感度なけい光定量法である点に特徴を有する。

本法は、さらに血漿中のperisoxalの定量にも応用することができた。

3) 呈色関連物質である。活性メチレン($XYCH_2$)のp-ジメチルアミノベンジリデン誘導体(I)のアルカリ加水分解の速度論的研究の結果、Iの炭素—炭素二重結合に対する水酸イオンの求核攻撃の速度と、Iの共役酸のpKa値との間に良好な直線関係の成立することが認められ、pKa値は、activated electrophilic olefinに対する求核攻撃における、X、Yグループの相対的な活性値を評価するパラメーターとして有用であることを明らかにした。

4) 置換 α -ベンゾイルシンナモニトリル誘導体の加水分解における、pH-rate profile および、置換基効果に基づき、その加水分解機構を明らかにした。

中間体の炭素—炭素結合の開裂過程に対する置換基効果および、活性化パラメーターの値は、置換基によるその遷移状態構造の違いを示唆することが認められた。

引用文献

- 1) A. Quilico, "The Chemistry of Heterocyclic Compounds: Five- and Six-Membered Compounds with Nitrogen and Oxygen," Vol. 17, ed. by R. H. Wiley, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1962, p. 85.
- 2) E. Hirai and M. Nagai, Shionogi Kenkyusho Nempo, **22**, 1 (1972).
- 3) S. Patai and Z. Rappoport, "The Chemistry of Alkenes," ed. by S. Patai, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1964, chapter 8.
- 4) M. Friedman and J. S. Wall, J. Org. Chem., **31**, 2888 (1966).
- 5) H. Shenhav, Y. Rappoport, and S. Patai, J. Chem. Soc. (B), **1970**, 469.
- 6) Z. Rappoport and D. Ladkani, Chem. Scr., **5**, 124 (1974).
- 7) T. Umeda, H. Imanishi, and E. Hirai, Chem. Pharm. Bull., **28**, 1230 (1980).
- 8) T. Umeda, H. Imanishi, and E. Hirai, Chem. Pharm. Bull., **28**, 3507 (1980).

- 9) S. C. Haydon, *Spectrosc. Lett.*, **8**, 815 (1975).
- 10) M. Machida, M. I. Machida, T. Sekino, and Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 1678 (1977).
- 11) S. Hashimoto, M. Shizu, and S. Takahashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 1757 (1976).
- 12) T. Umeda and E. Hirai, *Chem. Pharm. Bull.*, "in press."
- 13) C. F. Bernasconi, J. P. Fox, and S. Fornarini, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2810 (1980).
- 14) C. F. Bernasconi and G. D. Leonarduzzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 1361 (1980).
- 15) M. Calmon and J. P. Calmon, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1970**, 1885.
- 16) S. Patai and Z. Rappoport, *J. Chem. Soc.*, **1962**, 392.
- 17) T. Umeda and E. Hirai, *Chem. Pharm. Bull.*, "in press."
- 18) C. E. Lough and D. J. Currie, *Can. J. Chem.*, **44**, 1563 (1966).
- 19) M. Calmon, B. Arnaud-Lehujour, and J. P. Calmon, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1972**, 174.
- 20) J. E. Leffler, *J. Org. Chem.*, **31**, 533 (1966), and references therein.

論文の審査結果の要旨

本研究は医薬として用いられるものが多いイソキサゾール誘導体を、イソキサゾール-3-カルボン酸類に導いた上比色分析を行う方法を新に開発し、更に進んでピコグラムオーダーの分析を可能にするけい光分析法を開発し、ヒト血漿中の薬品の分析を可能にした。これに加えて比色分析の呈色本体である活性二重結合を有する化合物の加水分解機構を速度論を用いて明らかにした。本論文は薬学博士の称号を授与するに値するものである。