

Acknowledgment

This investigation was supported in part by Grant in Aid for Fundamental Scientific Research of the Ministry of Education and a grant from Tanabe Pharmaceutical Co., for which we express our appreciation.

The authors are grateful to Dr. J. Iwao for his interesting and helpful discussion, to Dr. K. Abe and to Dr. T. Okuda for screening tests, and to Miss F. Uesugi and Miss T. Fujii for elemental analyses.

Thanks are also due to M. Yamazaki, T. Iwakuma and Y. Masaki for their assistances in the experimental work.

References

- 1) To whom inquires concerning this paper should be directed.
- 2) Taken in part from the MS Thesis of Hiroshi Mori submitted to Gifu College of Pharmacy in March, 1965. Presented in part at the 19th General Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, Tokyo University, April 6, 1964.
- 3) R. N. Castle and K. Kaji, *Tetrahedron Letters*, 393 (1963)
- 4) These two compounds show significant tuberculostatic activity in vitro, viz., II_b and II_c hindered completely the growth of M. Tuber. 37RV in the concentration of 25 γ /ml and 10 γ /ml respectively.
K. Kaji, J. P., 476,019, 476,020 (1966)
- 5) W. I. Patterson, U. du Vigneaud, *J. Biol. Chem.*, **111**, 393 (1935); *ibid.*, **123**, 327 (1938); W. A. Bouner, *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 1034, 5089 (1952); R. Adams and A. Ferretti, *ibid.*, **81**, 4939 (1959)
- 6) W. E. Truce, D. P. Tate and D. N. Burdge, *ibid.*, **82**, 2872 (1960)
- 7) A. E. Lanzilotti, J. B. Ziegler, and A. C. Shabica, *ibid.*, **76**, 3666 (1954)
- 8) K. Kaji and M. Kuzuya, *Unpublished*.
- 9) R. N. Castle and K. Kaji, *Naturwissenschaften*, **51**, 38 (1964); R. N. Castle, K. Kaji and D. Wise, *J. Heterocyclic Chem.*, **3**, 541 (1966); K. Kaji and M. Kuzuya, *Unpublished*;
- 10) K. Dury, *Angew. Chem*, **77**, 282 (1964)
- 11) R. N. Castle and K. Kaji, *J. Heterocyclic Chem.*, **2**, 463 (1965)
- 12) R. N. Castle and K. Kaji, *Unpublished*.
- 13) T. Kuraishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **5**, 376 (1957); T. Kuraishi, *ibid.*, **6**, 641 (1958)

大野武男, 森逸男: クロロフルオレスセインの水銀反応について

Takeo Ohno, Itsuo Mori: Mercuration of Chlorofluoresceins

Mercuration of eight kinds of chlorofluorescein (2'-Cl, 4'-Cl, 2',4'-Cl, 4',5'-Cl, 2',7'-Cl, 2',5'-Cl, 2',4',5'-Cl, 2',4',7'-Cl-fl) was discussed and sterilizing effect of mercurichlorofluorescein was compared here.

フタレイン類の水銀化 (以下 Hg 化と略記) 反応に関しては古く White¹⁾ が fluorescein (以下 fl. と略記), Bromofl. (以下 Brfl. と略記) の Hg 化反応を報告し, 長瀬²⁾ 大野 は mercurochrome の製造条件について詳しく検討した. またフタレイン類の化合物の Hg 化合物の殺菌効果については Candeli³⁾ が eosin と Hg(OAc)₂ の反応生成物について, Petrilli⁴⁾ Rohatgi^{5),6)} らが数種の Brfl. の Hg化合物について報告している. しかるに Clfl.

の Hg 化合物に関する報文はみない。

著者らは 8 種の Clfl., 4',5'-Brfl. および fl. の Hg 化反応を行い, Hg の核置換位, 置換量および Hg 化合物の構造と殺菌効果の関連性を明らかにする目的をもって本研究を行った。

Hg(OAc)₂ を Hg 化剤として用いる fl. 誘導体の Hg 化反応について先に著者の一人²⁾大野は反応時の液性が Hg の核置換量に著しく影響することを報告したが, その後 Brown⁸⁾も同様の知見を述べている。前報に詳述したごとく, Br fl. においては pH7 以上の液性では Hg の核置換反応は行われがたく, pH 6~7 においても Br の脱離, Br と Hg の置換等の副反応が認められる。しかるに今回使用した Clfl. 類においては, か様な副反応を起さ

Table I Mercuration of 2', 7'-dichlorofluorescein

No.	Condition of mercuration		2',7'-Cl fl-Hg		Rf. of Paper Chromatography*		
	Temperature (°C)	Time (hr's)	Cl. fl-Hg Cl. fl	Hg analysis Found (%)	0.06	0.25	0.51
1	30-40	10	1.1	21.08	+++	+	+
2	30-40	30	1.2	24.14	++	+++	+
3	60-70	1	0.8	22.90	+++	+	+
4	60-70	5	0.8	20.45	+++	++	++
5	60-70	10	1.0	25.20	+++	++	+
6	60-70	20	1.6	23.04	++	+++	+
7	60-70	30	1.1	19.96	++++	+++	+
8	75-90	1	1.1	18.33	+++	++	+
9	75-90	5	1.2	26.56	+++	+	+
10	75-90	10	1.7	27.45	+++	++	+
11	75-90	20	1.2	19.80	++	+	++
12	75-90	30	1.2	18.81	+++	++	+
13	95-100	1	1.5	22.70	+++	+	+
14	95-100	5	1.5	23.21	++	+	+
15	95-100	10	2.1	28.36	+++	+	+
16	95-100	20	2.1	24.30	+	+	+
17	95-100	30	1.6	21.97	+++	+	+

1) E. C. White: J. Am. Chem. Soc., **48**, 8355 (1920); C. A., **15**, 536 (1921)

2) 長瀬, 大野: 薬誌, **73**, 357 (1953)

3) Addeb Candeli: Boll. ist. sivoterap. Milan., **28**, 252 (1949); C. A. **44**, 4655 (1950)

4) Ferdinando, Luigi; Petrilli: Ingiene moderna, **45**, 136 (1952); C. A., **47**, 8832 (1953)

5) H. L. Rohatgi., *etal*: Indiae J. Appl. Chem., **22**, 128 (1959); C. A., **54**, 15841 (1960)

6) *Idem.*, *etal*: *Ibid.*, **21**, 117 (1958); C. A., **53**, 11765 (1959)

7) 大野, 森: 岐阜薬科大学紀要, **10**, 60 (1960)

8) H. C. Brown., *etal*: J. Am. Chem. Soc., **77**, 2330 (1955)

* 展開溶媒 10% phenol 1 : n-NaOH 2 : H₂O 7 東洋濾紙 No. 50, 一次元上昇法

ないものと考えられる。

1) **Mecuration of 2',7'-dichlorofluorescein**: 著者らはまず, Hg の核置換位が 4' または 5' のみであると考えられる 2',7'-Clfl. について反応条件の検討を行なった. すなわち反応時の液性 pH 3~7 域において, 加熱温度を 20~100°, 反応時間を 5~30 hrs. として Hg を行い, 生成物を希 NaOH および希酸より再沈殿法によって精製したのち, その組成を調べた. Table I はその結果であるが, 生成物の組成は前報のごとく PC によって認識した.

表中 Rf 0.06 (赤色), 0.25 (赤橙色), 0.51 (橙色) にスポットとして示される化合物はそれぞれ 2',7'diCl 4',5'diHgOHfl., 2',7'diCl4' monoHgOHfl. ならび 2',7'Clfl. である.

実験の結果, 加熱反応時間 5 hrs では, いずれの pH 域においても反応の進行は不完全である. 10~20 hrs で反応はほとんど完了し diHgOH 体および mono HgOH 体の混合物が得られ, 未反応の Clfl. は僅かである. さらに加熱時間が 20 hrs 以上に及ぶときは Hg 化合物の分解により金属 Hg の遊離がみとめられる.

反応時の液性が pH 3 以下および pH 7 以上においては, Hg の核置換はほとんど行われず原料の回収にとどまる. 最も適当な液性は pH 4~5 であり, Hg(OAc)₂ の使用量の多少 (Clfl. に対して 1 モル相当量および 4 モル相当量) にかかわらず比較的低い pH 領域では diHgOH 体, 比較的高い pH 領域では monoHgOH 体の生成量が多い.

2) **Mercuration of 4',5'-dichlorofluorescein**: 4',5'diBrfl. の monoHgOH 体は mercurochrome (J.P. VII) であるが 4',5'Clfl. の Hg 化合物は文献に記載がない.

著者らは fl. の直接塩素化によって得た 4',5'Clfl. について Hg 化反応を行った. 1) と同様反応生成物を精製したのち, PC によってその組成をつぎのように推定した. すなわち PC において Rf 0.07 (赤色), 0.22 (赤橙色) を示す化合物はそれぞれ di-HgOH 体, mono-HgOH 体と考えられ, 0.33 (橙色) を示す化合物は 4',5' Clfl. である.

Table II Mercuration of Chlorofluoresceins

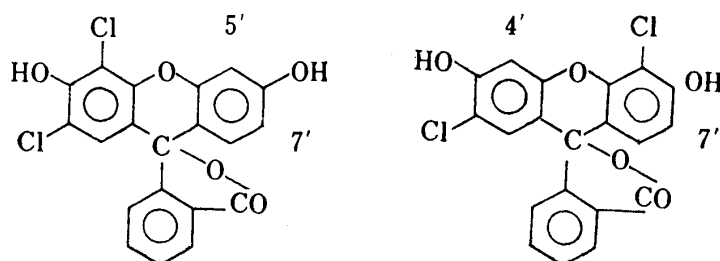
No.	Clfl. or Brfl.	Condition of Mercuration			
		molar ratio Cl-, Br-fl : Hg	Cl- or Brfl (g) (mol)	Hg (AcO) ₂ (g)	pH
(1)	Fl.	1 : 1.1	1.7 (1/200)	1.75	3-8
		1 : 2.0	1.7	3.19	3-8
		1 : 6.0	1.7	6.38	3-8
(2)	2'-Cl	1 : 1.1	1.23(1/300)	1.17	3-9
		2.0	1.23	2.12	3-9
		3.5	1.23	3.72	3-9
		9.0	1.23	10.09	3-9
(3)	4'-Cl	1 : 1.1	1.23(1/300)	1.17	3-9
		6.0	1.23	6.37	3-9
(4)	2',7'-Cl	1 : 1.1	2.02(1/200)	1.75	3-7
		: 4.0	2.02	6.37	3-7
(5)	4',5'-Cl	1 : 1.1	2.02(1/200)	1.75	3-7
		4.0	2.02	6.37	3-7

No.	Clfl. or Brfl.	Condition of Mercuration			
		molar ratio Cl-, Br-fl: Hg	Cl- or Br-fl (g) (mol)	Hg (AcO) ₂ (g)	pH
(6)	2', 4'-Cl	1 : 1.1	1.61 (2/500)	1.40	3-8
		4.0	0.61	5.61	3-8
(7)	2', 5'-Cl	1 : 1.1	0.81 (1/500)	0.70	3-7
		4.0	0.81	1.27	3-7
(8)	2', 4', 7'-Cl	1 : 1.1	1.09 (1/400)	0.88	3-8
(9)	2', 4', 5'-Cl	1 : 1.1	1.09 (1/400)	0.88	3-8
(10)	4', 5'-Br	1 : 1.1	1.2 (1/400)	0.88	3-8
		4.0	1.2	3.19	3-8

4', 5'/Clfl. と Hg(OAc)₂ との反応モル比を 1 : 1 としたときも, 1 : 4 としたときも, 生成物は何れも上記 3 物質で, monoHgOH 体または diHgOH を単独に得ることはできなかった. また pH 4~6 の範囲では diHgOH 体が monoHgOH 体より多量に (ほぼ 2 : 1 の割合) 生成し, pH 3 付近では原料の回収量が増し, pH 7 付近では monoHgOH の生成比が多くなり遊離 Hg 量も増すことは 1) と同様である.

3) Mercuration of 2'/4'dichlorofluorescein & 2'/5'dichlorofluorescein

両者の反応生成物を PC により検するとき, 前記 2 種の diClfl とくらべて異なる点は 4 スポットを認めることである. すなわち Table III に示したごとく 2'/4'/Clfl. においては Rf 0.18, 0.22, 0.37, 0.47 に, 2'/5'/Clfl. においては Rf 0.20, 0.31, 0.34, 0.41 に 4 スポットを認めた. 両 diClfl. はともに化学構造から明らかなごとく,



monoHgOH 体が 2 種生成する可能性がある. すなわち 2'/4'/Clfl. においては Rf 0.22, 0.37 に示される化合物が, 2'/5'/Clfl. においては Rf 0.31, 0.34 に示される化合物が monoHgOH 体であると推定される.

4) Mercuration of 2'/monochlorofluorescein & 4'/monochlorofluorescein: 両者の Hg 化反応についても 1) と同様に行い, 反応生成物を PC によって検した. その結果は Table III に示したごとく, 何れも 5 スポットを認め, 置換位, 置換数の異なる化合物の生成することを知った.

両化合物の Hg 化反応について共通な点は, Clfl. と Hg(OAc)₂ の反応モル比 1 : 4, 反応時の pH 4 において最も Hg 移入量が多く, triHgOH 体と考えられる化合物の生成も多い.

5) Mercuration of 2'/4'/7'/trichlorofluorescein & 2'/4'/5'/trichlorofluorescein: 両者の Hg 化反応によって得られる Hg 化合物はそれぞれ 1 種のみと考えられる. 実験の結果は Table III に示したごとく, 1 モル比以上の Hg(OAc)₂ を用い pH 4~5 で Hg 化を行うときは, mono-HgOH 体がほとんど単一に得られる.

Table III Properties of Mercuric compounds of Halogenofluoresceins

No.	Fl. -Hg	appearance	Analysis of		Rf. of Paper Chromatography					Phenol Coefficient	
			Hg(%)	Cl(%)	1	2	3	4	5		
(1)	fl.	(see Table IV)									3.4
(2)	2'-Cl	a : Red	26.29	10.29	.53 +++	.37 ++	.28 ++	.24 +	.14 +++		1.7
		b : Red	31.84	8.90	+ +++	++ ++++	++++ ++	++ +	++++ +		3.6
(3)	4'-Cl	a : Red	24.03	12.85	.45 +++	.33 ++	.28 +	.23 +	.18 ++++		1.1
		b : Red	40.95	11.35	+ +++	+ ++	++ +	+ +	++++ +		2.8
(4)	2', 7'-Cl	a : dk Red	20.13	14.85	.51 +	.25 +++	.06 ++++				2.5
		b : Red	21.53	14.59		+++ ++++	++++ +				3.2
(5)	4', 5'-Cl	a : dk Br	18.48	8.19	.33 +	.20 ++	.07 +++				1.5
		b : rd Br	22.18	11.04		+ ++	++ +				1.6
(6)	2', 4'-Cl	a : Red	13.05	4.97	.47 ++	.37 +	.22 +++	.18 +++			2.5
		b : Red	19.39	14.05	+ +++	+ ++	++ ++++	++++ +			2.0
(7)	2', 5'-Cl	a : Red	21.83	10.66	.41 ++	.34 +	.31 +++	.20 +			2.5
		b : Red	27.58	11.51	+ +++	++ ++	+++ ++++	++++ +			2.8
(8)	2', 4', 7'-Cl	a : pr Red	15.05	15.28	.36 +++	.31 +					1.1
		b : rd Br	16.93	10.74	+ +++	+++ +					2.0
(9)	2', 4', 5'-Cl	a : pr Red	26.20	13.38	.29 +++	.18 +					1.1
		b : Red	17.34	14.14		+++ +					1.8
(10)	4', 5'-Br	a : rd Or	26.26	21.56	.32 +	.22 ++	.12 ++				1.7
		b : Red	26.77	27.77		++ ++	++ +				2.4
(11)	Mercurochrome	a : Red	26.7		.34 +	.32 ++	.21 ++	.12 ++	.08 +++		1.8

* a : Clfl. : Hg = 1 : 1.1 * b : Clfl. : Hg = 1 : 4-6 rd : reddish, dk : dark, pr : pure Br : brown

6) **Mercuration of 4/5/dibromofluorescein** : mercurochrome の製造条件についてはすでに十分検討されているが、著者らが^{9),10)}前報において報告した合成法により得た純粋の 4/5/diBrfl. を用いて Hg を行った。その結果は Table III にみるごとく diHgOH 体, monoHgOH 体の混合物を得、反応時の液性は pH 4~5 が適当であることを再確認した。

7) **Mercuration of fluorescein** : 抗菌性を比較するため fl. と Hg(OAc)₂ の反応モル比を 1 : 8, 反応時の液性を pH 3~10 として Hg 化を行った。本反応においても、PC による観察によれば (Table III) Hg 置換数を異にする数種の化合物が混合して生成することが認められた。fl. の Hg 化反応および生成物質についての知見は別に報告する予定である。

9) 大野, 森, 他 : 本誌, 18, 40 (1962)

10) *Idem.* 薬誌., 84, 1134 (1964)

Table IV Complete Mercuriation of Fluorescein

No.	Fluorescein	pH at mercuriation	Yield of mercuri-fl.	Analysis of Hg
1	2.5 g	3.0	7.0 g	47.1%
2	"	3.4	7.6	49.2
3	"	4.0	8.5	55.9
4	"	4.6	8.7	57.9
5	"	5.3	9.5	58.6
6	"	6.4	9.2	58.6
7	"	7.2	8.7	56.0
8	"	8	8.2	54.6
9	"	9	7.1	51.7
10	"	10	6.7	49.0

8) Phenol coefficient of Mercuricomponnds.

前項で得た Clfl. 類の Hg 化合物の石炭酸係数を測定し Table II の結果を得た. これらの化合物の Hg 含有量と抗菌性の間には認むべき関係はなかったが, Cl の置換位が fl 核の 2' 位にある 2'/Cl-, 2'/7'/Cl-, 2'/4'/Cl-, 2'/5'/Cl-, 2'/4'/7'-Cl-fl. はいずれも 4' 位にある 4'/Cl-, 4'/5'/Cl-, 2'/4'/7'/Cl-fl. より概して石炭酸係数が大きかった.

実験の部

1) **Mercuriation of 2'/7'/dichlorofluorescein** : 2'/7'-Clfl. 2.0g (1/200mol) を 5% NaOH 10ml にとかけて 500ml 三頸フラスコ中に入れ, 30% HOAc を加えて 2'/7' Clfl. を沈殿させる. つぎに Hg(AcO)₂ 1.8g (1.1/200mol) を加え, n AcONa, n AcOH を加えて混液の pH を必要な値 (pH 3~7) に調節し, 全量を約 250 ml とし, 攪拌しつつ 10 hrs 以上煮沸して Hg 化を行った. 反応終了後 HOAc を加えて十分酸性とし, 沈殿を濾取して水洗したのち, 希 NaOH 溶液および希塩酸から再沈殿法により精製し, Cl⁻ の消失するまで水洗し風乾した.

2) **Mercuriation of other Chlorofluorescein** : Clfl. 類は一たん 5% NaOH と 30% AcOH から再沈殿したのち, Hg(AcO)₂ の必要量を加え, n NaOAc, n AcOH で所要の pH に調節する. 反応液は弱煮沸する程度に約 10hrs 攪拌しながら反応せしめる. pH 6 以下の液性で反応させたときはそのまま沈殿を濾取, 水洗し, pH 6 以上で反応させたときは冷後 HOAc を加えて酸性とし, 沈殿を濾取水洗する.

ここに得た沈殿は希 NaOH 溶液, 希塩酸より再沈殿を行って遊離した Hg などの不純物を除き, Cl⁻ の消失するまで十分水洗して風乾した.

3) Complete mercuriation of fluorescein

fl. 1 モルに対して Hg(OAc)₂ 8 モルを用い, 反応時の液性を pH 3~10 とした以外は 2) と同じように操作した. 反応の結果は Table に示したようである.

4) Analysis of Mercurichlorofluorescein

a) Hg の定量：試料中にハロゲン元素を含まないときは，試料を硫硝酸で分解したのち希釈し，Thiocyanometry を行うが，ハロゲンが含まれるときは JP VII 収載のマーキュロクロムの定量法 (Iodometry) に従って Hg を定量した。

b) ハロゲンの定量：マーキュロクロムの臭素の定量法を利用して定量を行った。すなわち試料約 100mg をルツボ中にはかり 10% NaOH 10 ml を加えて蒸発乾固したのち，600~650°C の電気炉内で約 10 分強熱する。熔融塊をビーカー中で希 HNO₃ とにかし，n/10 AgNO₃ 25.0 ml を加えてハロゲン化銀を沈殿させたのち過剰の AgNO₃ を硫酸第二鉄アンモニウム試液を指示薬として n/10 NH₄SCN で還測した (Volhard 法)

5) Phenol coefficient of mercuric compounds.

a) クロロフルオレスセインの Hg 化合物の Na 塩の調製：試料約 1g に 2.0% NaOH 溶液の計算量を加え，水浴上で蒸発乾固し P₂O₅ で乾燥した。

b) ブイヨン：常法にしたがって NaCl 10g ペプトン 20g，肉エキス 10g の水溶液 (pH 6.8) 2 l を試験管に 10ml ずつ分注し，120°C，2 atm で 15 分間高圧滅菌処理した。

c) 菌株：Staphylococcus aureus, FAD 209 p

d) 石炭酸係数：各倍数希釈薬剤液を常法にしたがって 10ml ずつカバー付試験管にとり，石炭酸希釈液とともに 20°C の恒温槽に入れ，白金耳 (径 4 mm) で薬剤を接種し，37°C で 48 hrs 培養し，菌の増殖の有無を観察して石炭酸係数を算出した。(山崎信子，島田敦子協力)

大野武男，岸田弘子，清水則子；毛髪中の水銀の定量法
ならびに水銀量について

Takeo Ohno, Hiroko Kishida, Noriko Shimizu:
Determination of Mercury in Hair of Man.

Mercury contained in hair of the farmers who engaged in sprinkling of mercuric agriculturals (17 samples) was determined by Dithizon Method. The relationship between quantity of mercury in the hair and that of agriculturals sprinkled was not found, but 7.5 ± 4.8 ppm of mercury in hair was detected, which was a little more than the normal value (6.0 ± 2.9 ppm) of Japanese, while the determination on mercury in hair of dental doctor shaw 9.8 ± 2.9 ppm, which was pretty more value than that 6.5 ± 2.4 ppm of normal subjects. (6 samples).

本研究は水銀農薬を撒布した農民の毛髪中の水銀 (以下 Hg と記す) の定量を，岐阜市より依頼されたので行ったものである。