53. 西本行雄, 豊島昭二: キレート生成能を有する化合物の薄層クロマトグラフィーに関する研究(第4報^{*1}) エピレナミン系薬物の薄層クロマトグラフィー

Yukio Nishimoto and Shoji Toyoshima: Studies on Thin-layer Chromatography of the Compounds carrying Chelating Ability. IV. Thin-layer Chromatography of Epirenamine Derivatives.

(Research Laboratories Eisai Co., Ltd.^{*2})

Epirenamine series of drugs can not well be separated by thin-layer chromatography (TLC) analysis even in various conditions. It is because of the chelate formation reactions of reagents with traces of metals in the adsorbents. To prevent this inconvenience, adsorbent was pre-treated with EDTA·2Na, and the TLC was developed with a solvent mixture of acetone-formic acid-water (7:1:2) which gave a better result. As a developing reagent, phosphomolybdic acid-ammonia method was found to be specific with a high limit of identification. Between R_M value and carbon number of alkyl groups combined to a nitrogen atom, almost a linear relation has been observed.

(Received October 28, 1964)

エピレナミン系薬物の薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略) による分離確認は通常の方法では tailing がはなはだしく良好な結果を得ることはむずかしい。これに対して Teichert 等¹⁾ は緩衝化したシリカゲルクロマト板を用い, Halmekaski²⁾ は molybdate, tungstate など吸着剤を処理してそれぞれエピレナミン, ノルエピレナミンの分離に成功している。

著者等が取りあげた 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-alkylaminoethanol 誘導体 (Group 1) の *dl*-epirenamine (I), *l*-epirenamine (II), *dl*-arterenol hydrochloride (III), および isopreterenol hydrochloride (IV) と 1-(3',4'-dihydroxyphenacyl)-4-alkylpiperazine dihydrochloride 誘導体 (Group 2) の 4-(2-hydroxypropyl) 体 (V), 4-(2-hydroxyethyl) 体 (VI), 4-methyl 体 (VII), および 4-*H*, hydrate 体 (VIII), 合計 8 種のエピレナミン系化合物も Kieselgel G. および Aluminiumoxid G. を用いる通常の TLC では tailing がはなはだしく良好な結果が得られなかった。そこでこれを前報³⁾ と同様に吸着剤中の金属とこれら薬物との錯化合物生成反応に起因するこ

*1 第3報: 本誌, 85, 235 (1965).

*2 Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo.

1) K. Teichert, E. Mutschler, *et al.*: Dtsch. Apotheker-Ztg., **100**, 283 (1960).

2) J. Halmekaski: Suomen Kemistilehti, **B36**, 58 (1963) (C. A., **59**, 2589 (1963)).

3) 豊島, 西本: 本誌, 85, 235 (1965).

とを確認し、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA・2Na) 処理 Kieselgel G. クロマト板を使用して迅速な分離確認を行ない得た。また R_M 値と窒素原子に結合している alkyl 基の炭素数との間に直線的な関係があることを見いだした。

I. クロマト板処理条件 著者らを取りあげた 8 種の化合物は普通の Kieselgel G. クロマト板ではもっともよい展開条件でも Fig. 1, に示すように tailing がはなはだしくこの種の化合物については普通のクロマト板を用いた場合良好な分離は期待できないものと考えられる。なお吸着剤に Aluminiumoxid G. を使用すると Fig. 1 の条件でもまったく展開されず原点にとどまる。

Fig. 1. Chromatographic Separation of the Epirenamine Derivatives on Layer of Kieselgel G.

Eluent: $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (1:1)
Color reagent: phosphomolybdic acid-ammonia

TABLE I. Concentration of the EDTA・2Na for Prevention of Tailing

Mole/L	Tailing of spot ^{a)}
0.05	±
0.10	—
0.30	—

a) ±: slightly
—: absence
Eluent: 70% acetone

これは試料スポット時、黄〜黄褐色にスポットが着色することから試料と吸着剤との間になんらかの反応が起こっていることが予想され、水溶液中で両者を混合すると黄色に着色し、pH が低下することより前報³⁾と同様に錯化合物生成反応によることを推定し、これを吸着剤の処理により阻止せんとしてその条件を検討した。

使用処理剤 (キレート剤) としては水溶性でしかもクロマト板活性化時の加熱 (110°, 60 分間) に耐えうる性質をもつことが必要で、アセチルアセトン、エチレンジアミン、クロモトロブ酸ナトリウム、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム、EDTA・2Na などの水溶性試薬中から耐熱性でしかも一般的なものとして EDTA・2Na がもっとも適当であると考え、これを使用することにしてその濃度を検討した。その結果 Table I に示すように 0.1M の濃度で処理した Kieselgel G. クロマト板を使用すれば良好な結果を得ることができ、これは前報³⁾の結論を支持するものである。

Fig. 2. Chromatographic Separation of Epirenamine Derivatives on Layer of Kieselgel G. treated with 0.1M EDTA・2Na

Eluent: $(\text{CH}_3)_2\text{CO-HCOOH-H}_2\text{O}$ (7:1:2)
Color reagent: phosphomolybdic acid-ammonia
M: mixture of the compounds from I to VIII

II. 展開溶媒 0.1M EDTA・2Na 処理 Kieselgel G. クロマト板を使用して試料が分離する展開溶媒を検討した。その結果 Table II に示すようにアセトン-ギ酸-水 (7:1:2) 系がもっとも良好な分離性を示した。しかしこの系でも Fig. 2 に示すように I と II, VII と VIII の相互分離は不可能であった。

この結果より有機溶媒としてアセトン 70% は必要で、酸ではギ酸 (90%) がほぼ 10% が適当でこれより多ければスポットは広がり、少なれば分離性が悪くなる。分離性にはギ酸量が大きな影響を与えていることがわかる。したがって以下の実験ではアセトン-ギ酸-水 (7:1:2) を用いた。

なお吸着剤に Aluminiumoxid G. を用いるとこの展開溶媒でも移動しない。したがって前報³⁾で考察したように EDTA・2Na 処理では Aluminiumoxid G. による

TABLE II. Solvent System

Solvent system		Separation ^{a)}	pH
Acetone-HCOOH-H ₂ O	(8 : 0.7 : 1.3)	—	1.8
"	(8 : 1 : 1)	—	1.3
"	(8 : 1.3 : 0.7)	—	0.6
"	(7 : 0.7 : 2.3)	+	2.1
"	(7 : 1 : 2)	++	1.6
"	(7 : 1.3 : 1.7)	+	1.2
Acetone-HOAc-H ₂ O	(7 : 1 : 2)	—	2.0
Acetone-0.1N HCl-H ₂ O	(7 : 1 : 2)	—	1.6
Acetone-HCOOH-AcOH-H ₂ O	(7 : 1 : 0.5 : 1.5)	+	1.3
MeOH-HCOOH-H ₂ O	(7 : 1 : 2)	—	2.2

a) — : Unsuccessful + : Not completely successful ++ : Successful
Color reagent : phosphomolybdic acid-ammonia

吸着反応を阻止することはできない。

III. 呈色試薬および検出限度 展開後の各試料の検出に塩化第二鉄, 2,6-ジブロムキノンクロロイミド, リンモリブデン酸などを用い, 呈色の薬物による特異性などを検討した. その結果 Table III に示すようにリンモ

TABLE III. Color Reactions

Group	Subst.	Reagent		
		FeCl ₃ -NH ₃ ^{a)}	PMo-NH ₃ ^{b)}	DB ^{c)}
1	I	dark-red	dark-violet	orange-violet
	II	"	"	"
	III	"	orange-violet	violet
	IV	"	orange	"
2	V	"	green	yellow
	VI	"	blue-green	"
	VII	"	"	"
	VIII	"	"	"

a) Ferric chloride reagent-ammonia vapor
b) Phosphomolybdic acid reagent-ammonia vapor
c) 2,6-Dibromoquinone 4-chlorimide reagent

TABLE IV. Limit of Identification

Group	Subst.	μg.		
		0.2	0.1	0.05
1	I	+ ^{a)}	+	+
	II	+	+	+
	III	+	+	±
	IV	+	+	—
2	V	+	+	±
	VI	+	+	±
	VII	+	+	±
	VIII	+	+	±

a) + : detectable ± : occasionally detectable — : nondetectable
Color reagent : phosphomolybdic acid-ammonia

Fig. 3. Relationship between R_m -values and Number of Carbon Atoms of Alkyl Group

● group 1
○ group 2

TABLE V. Relationship between R_m -values and Number of Carbon Atoms of Alkyl Group

Group	Subst.	C-number	Rf-value	R_m -value
1	I	1	0.70	-0.367
	II	1	"	"
	III	0	0.65	-0.267
	IV	3	0.80	-0.602
2	V	3	0.53	-0.049
	VI	2	0.42	0.140
	VII	1	0.35	0.270
	VIII	0	0.33	0.308

実 験 の 部

(1) 試料, 試薬および装置 試料: 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-alkylaminoethyl 誘導体 (Group 1). *dl*-epi-renamine (I), 東京化成特級品を EtOH 溶液として, *l*-epirenamine (II), E. Merck (Darmstadt) 品を EtOH 溶液として, *dl*-arterenol hydrochloride (III), Calbiochem Co. (Los Angeles) 品を水溶液として, isopreterenol hydrochloride (IV), Ward Blenkinsop Co. 品を水溶液としてそれぞれ 0.1% の濃度とし, その 0.01 ml. をスポットした。

1-(3',4'-dihydroxyphenacyl)-4-alkylpiperazine dihydrochloride 誘導体 (Group 2). 4-(2-hydroxypropyl) 体 (V): m.p. 251~253°(decomp.), 4-(2-hydroxyethyl) 体 (VI): m.p. 199~203°(decomp.), 4-methyl 体 (VII): m.p. 241~244°(decomp.), 4-*H*, hydrate 体 (VIII): m.p. 258°(decomp.), いずれも自社合成品を水に溶かして 0.1% の濃度とし, その 0.01 ml. をスポットした。

試薬: 吸着剤: Kieselgel G., Aluminiumoxid G. とともに Merck 社品を使用。リンモリブデン酸試液: 特級品の 5% MeOH 溶液。塩化第二鉄試液: 特級 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の 0.5% EtOH 溶液。褐色びんに貯える。2,6-ジブロムキノン-4-クロロイミド試液: 特級品の 0.5% EtOH 溶液。フェリシアン化カリウム試液: 特級品の 1% 水溶液。

その他有機溶媒類, アンモニア水, ギ酸 (90%) は市販特級品をそのまま, 0.1M EDTA·2Na 溶液およびクロマト装置は前報³⁾と同様のものをそれぞれ使用した。また水は全ガラス製再蒸留水製造装置で再蒸留して使用した。

(2) 試料のクロマト分離 0.1M EDTA·2Na 処理クロマト板³⁾の一方の端から 2 cm. の距離に 2 cm. 間隔に各試料をキャピラールでスポットし風乾後, アセトン-ギ酸 (90%) -水 (7:1:2) で 10 cm. 展開する。展開終了後クロマト板を室温で風乾しリンモリブデン酸試液をスプレー後アンモニア蒸気にさらして試料のスポットを

リブデン酸-アンモニア法が薬物による呈色に特異性があり適当であった。またフェリシアン化カリウムを用いると Group 1 のみが赤色を呈するので Group 2 との区別が可能である。

さらにリンモリブデン酸-アンモニア法による各薬物の検出限度は Table IV に示すようにいずれも 0.1 μg . であった。

IV. R_m 値と化学構造との関連性 以上の条件で測定した R_m ($=\log (1/R_f - 1)$) 値⁴⁾と両グループの窒素原子に結合せる alkyl 基の炭素原子数との間になんらかの関連性が見いだされないかと考え検討したところ Table V, Fig. 3 に示すように少数の実験例ではあるがこれらの系列の薬物においてはほぼ直線的な関係が存在するように思われ, その傾向は両グループともに同様であった。

4) E. C. Bate-Smith, R. G. Westall: Biochim. et Biophys. Acta, 4, 427 (1950).

確認する。

(3) 検出限度の測定 各試料の 0.05, 0.1, および 0.2 μg . が 0.01 ml. 中に含まれる溶液を調製し, その 0.01 ml. を (2) と同様に操作して展開後, 風乾しリンモリブデン酸試液-アンモニア法でスポットの有無を検する。

本研究に当たり終始御指導, 御鞭達をいただいた京都大学薬学部 田中 久博士に, 種々御示唆をいただいた同大学 横山 陽博士に厚く感謝いたします。また発表の機会を与えられた内藤豊次社長, 横山復次研究部門長, 田辺 普研究所長, 末永栄一試製所長, 試料の一部を提供された当研究所 田中 悟氏に感謝します。

エーザイ株式会社研究所

〔薬 学 雑 誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
85 (4) 331 ~ 334 (1965)

UDC 547.831.1.07 : 547'146'14/15

54. 加藤鉄三, 山中 宏, 引地 学: Quinoline N-Oxide と Alkylmagnesium Halide との反応

Tetsuzo Kato, Hiroshi Yamanaka, and Manabu Hikichi: Reaction of Quinoline N-Oxide with Alkylmagnesium Bromide.

(Pharmaceutical Institute, School of Medicine, Tohoku University*¹)

The reaction between quinoline N-oxide (I) and seven kinds of fatty Grignard reagents (R=methyl, ethyl, propyl, isopropyl, cyclohexyl, benzyl and phenethyl) has been studied and the production of 2-substituted quinoline N-oxide (II), 2-substituted quinoline (III) and quinoline (IV) have been observed. II and IV had never been produced in the Grignard reaction with I and the mechanism has been discussed.

(Received December 18, 1964)

従来, pyridine N-oxide あるいは quinoline N-oxide に対する Grignard 反応はいくつか報告されているが¹⁻⁴⁾ いずれも phenylmagnesium bromide を試薬としたものである。またその成績体は, 2-phenylpyridine あるいは 2-phenylquinoline であり, 収率も低く (16~30%) 合成面よりみて必ずしも有利な方法とはいえない憾みがあった。これに関し著者等は⁵⁾ この反応の改良検討を行なった結果, その反応経過をある程度解明すると同時に収率の向上にも成功し, たとえば 2-phenylquinoline 誘導体の合成法として有利な方法 (最高収率 95%) であることを報告した。しかしながら脂肪族 Grignard 試薬に対しての反応は文献上, いまだ知られていない。著者等はこの見地より, 脂肪族 Grignard 反応に検討を加えたところ, 合成面にも十分利用でき得ることを知ったので, その間の経過を報告する。

Chart 1.

*¹ Kita-4-bancho, Sendai-shi, Miyagi-ken.

1) M. Colonna: Boll. Sci. facolta chim. Ind., Bologna 1940, No. 4, 134 (C. A., 34, 7290 (1940)).

2) 落合, 有馬: 本誌, 69, 51 (1949).

3) M. Colonna, A. Risalti: Gazz. chim. ital., 83, 58 (1953).

4) G. Kobayashi: 本誌, 70, 381 (1950).

5) T. Kato, H. Yamanaka: J. Org. Chem., 30, 910 (1965).